



등록특허 10-2520550



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월12일
(11) 등록번호 10-2520550
(24) 등록일자 2023년04월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2887 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7035401
- (22) 출원일자(국제) 2021년03월17일
심사청구일자 2022년10월12일
- (85) 번역문제출일자 2022년10월12일
- (65) 공개번호 10-2022-0145411
- (43) 공개일자 2022년10월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/022779
- (87) 국제공개번호 WO 2021/188681
국제공개일자 2021년09월23일
- (30) 우선권주장
202010188038.1 2020년03월17일 중국(CN)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문현
JP2018508215 A
US20170073664 A1

(73) 특허권자
셀룰라 바이오메디신 그룹, 인크.
미국 메릴랜드 (우편번호 20850) 롤리 메디컬 센터 드라이브 9605 스위트 100

(72) 발명자
야오, 이홍
중국 홍콩 애드미럴티 넘버89 퀸즈웨이 타워 투 리포 센터 4쓰 플로어 룸 417
황, 지아치
중국 홍콩 애드미럴티 넘버89 퀸즈웨이 타워 투 리포 센터 4쓰 플로어 룸 417
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 CD19 및 CD20을 표적화하는 조합된 키메라 항원 수용체 및 그의 적용

(57) 요약

본 발명은 CD19 및 CD20을 표적화하는 조합된 키메라 항원 수용체 및 그의 적용을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 CD19를 표적화하는 scFv, CD20을 표적화하는 scFv, 헌지 영역, 막획단 영역, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, CD19 및 CD20을 표적화하는 조합된 키메라 항원 수용체를 제공한다. 본 발명은 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 분자, 상응하는 발현 벡터, CAR-T 세포, 및 그의 적용을 제공한다. 실험 결과는 본 발명에 의해 제공된 키메라 항원 수용체가 종양 세포에 대하여 극도로 높은 사멸 능력을 나타낸다는 것을 보여준다. 본 발명의 키메라 항원 수용체는 CD19 및/또는 CD20 양성 세포를 표적화하고, CD19 및/또는 CD20 양성 B-세포 림프종, 백혈병 및 다른 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

A61K 39/001112 (2018.08)

A61P 35/02 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 14/70575 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

야오, 신

중국 홍콩 애드미럴티 넘버89 퀸즈웨이 타워 투 리
포 센터 4쓰 플로어 룸 417

주, 스구이

중국 홍콩 애드미럴티 넘버89 퀸즈웨이 타워 투 리
포 센터 4쓰 플로어 룸 417

리, 엔펭

중국 홍콩 애드미럴티 넘버89 퀸즈웨이 타워 투 리
포 센터 4쓰 플로어 룸 417

웨이, 위티엔

중국 홍콩 애드미럴티 넘버89 퀸즈웨이 타워 투 리
포 센터 4쓰 플로어 룸 417

(30) 우선권주장

16/877,069 2020년05월18일 미국(US)

PCT/CN2020/109645 2020년08월17일 중국(CN)

63/154,032 2021년02월26일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

이중특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포를 포함하는, B-세포 백혈병 또는 B-세포 림프종으로부터 선택되는 B-세포 악성 종양을 치료하기 위한 제약 조성물로서, 상기 이중특이적 CAR이 항-CD20 항원-결합 영역 및 항-CD19 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 이중특이적 CAR이 서열식별번호: 16에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, B-세포 악성종양이 비-호지킨 림프종인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, B-세포 악성종양이 만성 림프구 백혈병 (CLL), B-세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 미만성 거대 B 세포 림프종 (DLBCL), 또는 그의 조합인 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, T 세포 또는 NK 세포가 동종이계 또는 자가인 제약 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

서열식별번호: 16에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 이중특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)로서, 항-CD20 항원-결합 영역 및 항-CD19 항원-결합 영역을 포함하는 이중특이적 CAR.

청구항 7

이중특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 단리된 면역 세포로서, 상기 이중특이적 CAR이 서열식별번호: 16에 기재된 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 이중특이적 CAR이 항-CD20 항원-결합 영역 및 항-CD19 항원-결합 영역을 포함하는 것인 단리된 면역 세포.

청구항 8

제7항에 있어서, T 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포인 단리된 면역 세포.

청구항 9

이중특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 면역 세포를 포함하는, B-세포 백혈병 또는 B-세포 림프종으로부터 선택되는 B-세포 악성 종양을 치료하기 위한 제약 조성물로서, 상기 이중특이적 CAR이 서열식별번호: 16에 기재된 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 이중특이적 CAR이 항-CD20 항원-결합 영역 및 항-CD19 항원-결합 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물의학 분야 및 더욱 특히, CD19 및 CD20을 표적화하는 조합된 키메라 항원 수용체 및 그의 적용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

혈관계의 악성 종양은 인간 악성 종양의 약 10%를 차지하며, 혈관계의 악성 종양 중 95%는 B 림프구로부터 유래된 것이다. 전통적인 화학 요법 및 방사선 요법은 혈관계의 악성 종양 치료에서 중요한 역할을 한다. 일부 환자는 상당한 효과를 보였지만, 대부분의 환자는 치유되기 어렵다. 새롭고, 효과적인 치료법이 본 분야에서 최고 관심사가 되고 있다.

[0003]

입양 T 세포 요법은 악성 종양의 임상 치료에서 강력한 효능 및 밝은 전망을 나타내었다. 현재, 혈액학적 종양을 치료하는 데 있어 가장 유망한 방법 중 하나인 것으로 간주되고 있다. CD19는 대부분의 B 세포 악성종양의 표면에서 고도로 발현된다. CD19-발현 B 세포의 재발성, 불응성 악성 종양을 표적화하기 위해 키메라 항원 수용체 (CAR)-변형된 T 세포를 독립적으로 사용하는 다기관이 전례 없는 성공을 달성하였다. 현재, FDA 승인을 받은 두 CAR-T 제품 모두 CD19 항원을 표적화하고 있으며, 예컨대, 만성 림프구 백혈병과 같은 그의 적응증도 확대되고 있다. 항-CD19 CAR-T의 효능은 탁월하지만, 많은 연구에서 CD19 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포 요법에도 많은 문제가 있는 것으로 밝혀졌다. 여전히 일부 환자에서는 치료 결과가 불량하고, 쉽게 재발되고 있다. 그 이유는 항원 회피에 대한 종양 세포의 감수성을 포함한다. 예를 들어, CD19 CAR-세포 요법의 최근 실험에 따르면, 환자의 90%가 완전 관해를 달성하였지만, 이들 환자 중 11%에서는 결국 재발하였고, 재발 환자는 주로 CD19-음성 종양 환자였다. 특히, 펜실베니아 의과 대학(University of Pennsylvania School of Medicine)에서 CART19를 재발성, 불응성 급성 B-세포 림프종 (R/R B-ALL) 치료에 사용함으로써 수행된 임상 시험에서 환자 중 최대 94%가 완전 관해를 달성하였다. 상기 임상 시험의 초기 반응률은 높았지만, 완전 관해를 달성한 치료 1개월 후 환자 중 거의 40%에서 재발이 나타났고, 재발 환자 중 60% 초과의 환자는 CD19-음성 종양 세포 회피를 보였다. 항원 회피는 NY-ESO1을 발현하는 입양 전달 특이적 T 세포 수용체 및 흑색종을 치료하는 암 백신에서 발견되었다. 자발적 돌연변이 및 선택적 확장이 항원 회피의 주요 원인이다.

[0004]

따라서, 종양을 효과적으로 치료하고, 항원 회피를 예방하는 방법 개발이 시급히 요구되고 있다.

발명의 내용

[0005]

본 발명의 목적은 종양을 효과적으로 치료하고, 항원 회피를 예방하는 방법을 제공하는 것이다.

[0006]

본 발명의 목적은 CD19 및 CD20을 표적화하는 조합된 키메라 항원 수용체, 및 그의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0007]

구체적으로, 본 발명의 목적은 CD19 및 CD20을 표적화하는 조합된 키메라 항원 수용체의 서열 뿐만 아니라, 변형된 T 세포 (CART-19/20)의 제조 방법 및 활성 확인을 제공하는 것이다. 본 발명은 CD19 및 CD20 양성 B 세포 림프종의 치료에 사용하기 위한 키메라 항원 수용체 구조를 제공한다.

[0008]

본 개시내용은 이중특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다. 이중특이적 CAR은 (i) 각각 서열식별번호 (SEQ ID NO:) 4 및 서열식별번호 3에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L1) 및 중쇄 가변 영역 (V_H1)을 포함하는 항-CD20 항원-결합 영역; 및 (ii) 각각 서열식별번호 5 및 서열식별번호 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L2) 및 중쇄 가변 영역 (V_H2)을 포함하는 항-CD19 항원-결합 영역을 포함할 수 있다.

[0009]

특정 실시양태에서, V_L1 은 V_H1 의 N-말단에 위치한다. 특정 실시양태에서, V_H2 는 V_L2 의 N-말단에 위치한다.

[0010]

항-CD20 항원-결합 영역은 CD20에 특이적으로 결합하는 단일 쇄 가변 단편 (scFv)일 수 있다. 항-CD19 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 scFv일 수 있다. 특정 실시양태에서, CD20에 특이적으로 결합하는 scFv는 CD19에 특이적으로 결합하는 scFv의 N-말단에 위치한다.

[0011]

이중특이적 CAR은 (a) 리더 서열, (b) 헌지 영역, (c) 막횡단 도메인, (d) 적어도 하나의 공동-자극 신호전달 영역, (e) 세포질 신호전달 도메인, 또는 (f) 그의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

[0012]

공동-자극 신호전달 영역은 4-1BB (CD137), CD28, OX40, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD70, CD134, PD1, Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR, TLR2, 또는 그의 조합으로부터 유래된 것일 수 있다.

[0013]

세포질 신호전달 도메인은 CD3ζ로부터 유래된 것일 수 있다.

- [0014] 헌지 영역은 Ig4, CD8, CD28, CD137, 또는 그의 조합으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0015] 막황단 도메인은 CD8, CD28, CD3 ε, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 또는 그의 조합으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0016] 특정 실시양태에서, 이중특이적 CAR은 서열식별번호 16에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0017] 본 개시내용은 본 이중특이적 CAR을 발현하는 면역 세포를 제공한다. 면역 세포는 T 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포일 수 있다. 면역 세포는 동종이개 또는 자가일 수 있다.
- [0018] 본 이중특이적 CAR을 코딩하는 핵산 또한 본 개시내용에 의해 포함된다.
- [0019] 본 개시내용은 본 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0020] 본 개시내용은 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 그를 필요로 하는 대상체에게 면역 세포를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0021] 암은 혈액학적 암일 수 있다. 암은 B 세포 악성종양일 수 있다. 암은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 및/또는 다발성 골수종일 수 있다. 암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발성 골수종 (MM), 만성 림프구 백혈병 (CLL), 만성 골수형성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 미만성 거대 B 세포 림프종 (DLBCL), 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 제1 측면에서, 키메라 항원 수용체의 구조가 하기 식 I로 제시된 것인, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다:
- [0023] L-scFv1-I-scFv2-H-TM-C-CD3 ζ (I)
- [0024] 상기 식에서,
- [0025] 각 "-"은 독립적으로 링커 웹티드 또는 웹티드 결합이고;
- [0026] L은 임의적 신호 웹티드 서열이고;
- [0027] I는 가요성 링커이고;
- [0028] H는 임의적 헌지 영역이고;
- [0029] TM은 막황단 도메인이고;
- [0030] C는 공동-자극 신호전달 분자이고;
- [0031] CD3 ζ 는 CD3 ζ로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이고;
- [0032] scFv1 및 scFv2 중 하나는 CD19를 표적화하는 항원 결합 도메인이고, 나머지 다른 하나는 CD20을 표적화하는 항원 결합 도메인이다.
- [0033] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv1은 CD20을 표적화하는 항원 결합 도메인이고, scFv2는 CD19를 표적화하는 항원 결합 도메인이다.
- [0034] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD20을 표적화하는 항원 결합 도메인의 구조는 하기 식 A 또는 B로 제시되어 있다:
- [0035] $V_{H1}-V_{L1}$ (A); $V_{L1}-V_{H1}$ (B)
- [0036] 상기 식에서, V_{H1} 은 항-CD20 항체 중쇄 가변 영역이고; V_{L1} 은 항-CD20 항체 경쇄 가변 영역이고; "—"은 링커 웹티드 또는 웹티드 결합이다.
- [0037] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD20을 표적화하는 항원 결합 도메인의 구조는 식 B로 제시되어 있다.
- [0038] 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_{H1} 의 아미노산 서열은 서열식별번호 1에 제시되어 있고, V_{L1} 의 아미노산 서열은 서열식별번호 2에 제시되어 있거나; 또는
- [0039] V_{H1} 의 아미노산 서열은 서열식별번호 3에 제시되어 있고, V_{L1} 의 아미노산 서열은 서열식별번호 4에 제시되어 있다.

- [0040] 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_{H1} 및 V_{L1} 은 가요성 링커 (또는 링커 웹티드)로 연결되고, 가요성 링커 (또는 링커 웹티드)는 서열식별번호 7 (GGGGS)에 제시된 바와 같은, 1-4, 바람직하게, 2-4, 더욱 바람직하게, 3-4개의 보존적 서열이다.
- [0041] 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_{H1} 및 V_{L1} 은 서열식별번호 19에 제시된 바와 같은 가요성 링커로 연결된다.
- [0042] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD19를 표적화하는 항원 결합 도메인의 구조는 하기 식 C 또는 D로 제시되어 있다:
- [0043] $V_{L2}-V_{H2}$ (C); $V_{H2}-V_{L2}$ (D)
- [0044] 상기 식에서, V_{L2} 는 항-CD19 항체 경쇄 가변 영역이고; V_{H2} 는 항-CD19 항체 중쇄 가변 영역이고; “-”은 링커 웹티드 또는 웹티드 결합이다.
- [0045] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD19를 표적화하는 항원 결합 도메인의 구조는 식 D로 제시되어 있다.
- [0046] 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_{L2} 의 아미노산 서열은 서열식별번호 5에 제시되어 있고, V_{H2} 의 아미노산 서열은 서열식별번호 6에 제시되어 있다.
- [0047] 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_{H2} 및 V_{L2} 는 가요성 링커 (또는 링커 웹티드)로 연결되고, 가요성 링커 (또는 링커 웹티드)는 서열식별번호 7 (GGGGS)에 제시된 바와 같은, 1-4, 바람직하게, 2-4, 더욱 바람직하게, 3-4개의 보존적 서열이다.
- [0048] 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_{H2} 및 V_{L1} 은 서열식별번호 20에 제시된 바와 같은 가요성 링커로 연결된다.
- [0049] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv1 및/또는 scFv2는 마우스 유래, 인간화, 인간화 및 마우스 유래 키메라, 또는 완전 인간화 단일 쇄 항체 가변 영역 단편이다.
- [0050] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 키메라 항원 수용체의 구조는 하기 식 II로 제시된다:
- [0051] L- $V_{L1}-V_{H1}-I-V_{H2}-V_{L2}-H-TM-C-CD3 \zeta$ (II)
- [0052] 상기 식에서, 각 요소는 상기 기술된 바와 같다.
- [0053] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 가요성 링커 I의 서열은 서열식별번호 7 (GGGGS)에 제시된 바와 같은, 2-6, 바람직하게, 3-4개의 보존적 서열을 포함한다.
- [0054] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 가요성 링커 I의 서열은 서열식별번호 7에 제시된 바와 같다.
- [0055] 또 다른 바람직한 실시양태에서, L은 CD8, CD28, GM-CSF, CD4, CD137, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질의 신호 웹티드이다.
- [0056] 또 다른 바람직한 실시양태에서, L은 CD8로부터 유래된 신호 웹티드이다.
- [0057] 또 다른 바람직한 실시양태에서, L의 아미노산 서열은 서열식별번호 8에 제시되어 있다.
- [0058] 또 다른 바람직한 실시양태에서, H는 CD8, CD28, CD137, Ig4, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질의 힌지 영역이다.
- [0059] 또 다른 바람직한 실시양태에서, H는 Ig4로부터 유래된 힌지 영역이다.
- [0060] 또 다른 바람직한 실시양태에서, H의 아미노산 서열은 서열식별번호 9에 제시되어 있다.
- [0061] 또 다른 바람직한 실시양태에서, TM은 CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질의 막횡단 영역이다.
- [0062] 또 다른 바람직한 실시양태에서, TM은 CD8 또는 CD28로부터 유래된 막횡단 영역이다.
- [0063] 또 다른 바람직한 실시양태에서, TM의 서열은 서열식별번호 10 또는 11에 제시되어 있다.
- [0064] 또 다른 바람직한 실시양태에서, C는 OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD134, 4-1BB (CD137),

PD1, Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR, TLR2, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질의 공동-자극 신호전달 분자이다.

[0065] 또 다른 바람직한 실시양태에서, C는 4-1BB 또는 CD28로부터 유래된 공동-자극 신호전달 분자이다.

[0066] 또 다른 바람직한 실시양태에서, C의 아미노산 서열은 서열식별번호 12 또는 13에 제시되어 있다.

[0067] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD3ζ의 아미노산 서열은 서열식별번호 14에 제시되어 있다.

[0068] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CAR의 아미노산 서열은 서열식별번호 15 또는 16에 제시되어 있다.

[0069] 특정 실시양태에서, 항-CD20 항원-결합 영역은 서열식별번호 3 또는 서열식별번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0070] 특정 실시양태에서, 항-CD20 항원-결합 영역은 서열식별번호 4 또는 서열식별번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0071] 특정 실시양태에서, 항-CD19 항원-결합 영역은 서열식별번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0072] 특정 실시양태에서, 항-CD19 항원-결합 영역은 서열식별번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0073] 항-CD20 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 오파투무맙(Ofatumumab) 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 3의 위치 30-35, 위치 50-66, 위치 99-111에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3), 및 Leu16 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 1의 위치 31-35, 위치 50-66, 위치 99-111에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함할 수 있다.

[0074] 항-CD20 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 오파투무맙 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 4의 위치 24-34, 위치 50-56, 위치 89-97에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3), 및 Leu16 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 2의 위치 24-33, 위치 49-55, 위치 88-96에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약

90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함할 수 있다.

[0075] 항-CD20 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 오파투무맙 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 40, 서열식별번호 41, 서열식별번호 42에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3), 및 Leu16 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 47, 서열식별번호 49, 서열식별번호 51에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함할 수 있다.

[0076] 항-CD20 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 오파투무맙 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 43, 서열식별번호 44, 서열식별번호 45에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3), 및 Leu16 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 54, 서열식별번호 56, 서열식별번호 58에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함할 수 있다.

[0077] 특정 실시양태에서, 항-CD20 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 오파투무맙 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 3의 위치 30-35, 위치 50-66, 위치 99-111에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함하고, 항-CD20 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 오파투무맙 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 4의 위치 24-34, 위치 50-56, 위치 89-97에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함한다.

[0078] 특정 실시양태에서, 항-CD20 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 오파투무맙 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 40, 서열식별번호 41, 서열식별번호 42에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함하고, 항-CD20 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 오파투무맙 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 43, 서열식별번호 44, 서열식별번호 45에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함한다.

[0079] 특정 실시양태에서, 항-CD20 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 Leu16 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 1의 위치 31-35, 위치 50-66, 위치 99-111에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함하고, 항-CD20 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 Leu16 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 2의 위치 24-33, 위치 49-55, 위치 88-96에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함한다.

[0080] 특정 실시양태에서, 항-CD20 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 Leu16 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 47, 서열식별번호 49, 서열식별번호 51에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함하고, 항-CD20 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 Leu16 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 54, 서열식별번호 56, 서열식별번호 58에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함한다.

[0081] 항-CD19 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 FMC63 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 6의 위치 31-35, 위치 50-65, 위치 98-109에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 90%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함할 수 있다.

도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함할 수 있다.

[0082] 항-CD19 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 FMC63 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 5의 위치 24-34, 위치 50-56, 위치 89-97에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함할 수 있다.

[0083] 항-CD19 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 FMC63 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 60, 서열식별번호 61, 서열식별번호 62에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함할 수 있다.

[0084] 항-CD19 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 FMC63 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 63, 서열식별번호 64, 서열식별번호 39에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 81%, 적어도 또는 약 82%, 적어도 또는 약 83%, 적어도 또는 약 84%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 또는 약 100% 동일한 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함할 수 있다.

[0085] 특정 실시양태에서, 항-CD19 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 FMC63 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 6의 위치 31-35, 위치 50-65, 위치 98-109에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함하고, 항-CD19 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 FMC63 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 5의 위치 24-34, 위치 50-56, 위치 89-97에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함한다.

[0086] 특정 실시양태에서, 항-CD19 항원-결합 영역의 중쇄 가변 영역은 FMC63 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 60, 서열식별번호 61, 서열식별번호 62에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함하고, 항-CD19 항원-결합 영역의 경쇄 가변 영역은 FMC63 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호 63, 서열식별번호 64, 서열식별번호 39에 기재된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3)과 동일한 3개의 CDR을 포함한다.

[0087] 본 발명의 제2 측면에서, 본 발명의 제1 측면의 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0088] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 핵산 분자는 단리된 것이다.

[0089] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호 17 또는 18에 제시되어 있다.

[0090] 본 발명의 제3 측면에서, 본 발명의 제2 측면의 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0091] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 벡터는 DNA 및 RNA를 포함한다.

[0092] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 벡터는 플라스미드, 바이러스 벡터, 트랜스포존, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0093] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 벡터는 DNA 바이러스 및 레트로바이러스 벡터를 포함한다.

- [0094] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 백터는 렌티바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 백터, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0095] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 백터는 렌티바이러스 백터이다.
- [0096] 본 발명의 제4 측면에서, 본 발명의 제3 측면의 백터를 포함하거나, 또는 본 발명의 제2 측면의 외인성 핵산 분자가 그의 게놈 내에 통합되어 있거나, 또는 본 발명의 제1 측면의 키메라 항원 수용체를 발현하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0097] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포는 단리된 세포이다.
- [0098] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포는 유전자 조작된 세포이다.
- [0099] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다.
- [0100] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포는 CAR-T 세포 및/또는 CAR-NK 세포이다.
- [0101] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포는 CD19 및 CD20, 둘 모두를 표적화한다.
- [0102] 본 발명의 제5 측면에서, 본 발명의 제2 측면의 핵산 분자 또는 본 발명의 제3 측면의 백터를 T 세포로 형질도입하여 CAR-T 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 본 발명의 제1 측면의 키메라 항원 수용체를 발현하는 CAR-T 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0103] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 방법은 수득된 CAR-T 세포의 기능 및 효과를 검출하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0104] 본 발명의 제6 측면에서, 본 발명의 제1 측면의 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제2 측면의 핵산 분자, 본 발명의 제3 측면의 백터, 또는 본 발명의 제4 측면의 숙주 세포, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제제를 제공한다.
- [0105] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제제는 액체 제제이다.
- [0106] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제제의 제형(formulation of the preparation)은 주사제이다.
- [0107] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제제는 본 발명의 제4 측면의 숙주 세포를 포함하고, 숙주 세포의 농도는 1×10^3 - 1×10^8 개의 세포/ml, 바람직하게, 1×10^4 - 1×10^7 개의 세포/ml이다.
- [0108] 본 발명의 제7 측면에서, 종양 또는 암 예방 및/또는 치료용 의약 또는 제제의 제조를 위한, 본 발명의 제1 측면의 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제2 측면의 핵산 분자, 본 발명의 제3 측면의 백터, 또는 본 발명의 제4 측면의 숙주 세포의 용도를 제공한다.
- [0109] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 종양은 혈액학적 종양, 고형 종양, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 바람직하게, 종양은 혈액학적 종양이다.
- [0110] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 혈액학적 종양은 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발성 골수종 (MM), 만성 림프구 백혈병 (CLL), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 미만성 거대 B 세포 림프종 (DLBCL), 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0111] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 고형 종양은 위암, 위암의 복막 전이, 간암, 백혈병, 신장암, 폐암, 소장암, 골암, 전립선암, 결장직장암, 유방암, 대장암, 자궁경부암, 난소암, 림프종, 비인두 암종, 부신 종양, 방광 종양, 비소세포 폐암 (NSCLC), 신경교종, 자궁내막암, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0112] 본 발명의 제8 측면에서, 용기, 및 상기 용기에 위치하는, 본 발명의 제2 측면의 핵산 분자 또는 본 발명의 제3 측면의 백터를 포함하는, 본 발명의 제4 측면의 세포의 제조를 위한 키트를 제공한다.
- [0113] 본 발명의 제9 측면에서, 암 또는 종양의 예방 및/또는 치료를 위한 본 발명의 제4 측면의 세포 또는 본 발명의 제6 측면의 제제의 용도를 제공한다.
- [0114] 본 발명의 제10 측면에서, 적절한 양의 본 발명의 제4 측면의 세포, 또는 본 발명의 제6 측면의 제제를 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0115] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 질환은 암 또는 종양이다.

- [0116] 본 개시내용은 이중특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제공한다. 이중특이적 CAR은 (i) 경쇄 가변 영역 (V_L1) 및 중쇄 가변 영역 (V_H1)을 포함하는 항-CD20 항원-결합 영역, 및 (ii) 경쇄 가변 영역 (V_L2) 및 중쇄 가변 영역 (V_H2)을 포함하는 항-CD19 항원-결합 영역을 포함할 수 있다. V_L1 은 각각 서열식별번호 43, 서열식별번호 44, 서열식별번호 45에 기재된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 또는 약 95% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR), CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함할 수 있다. V_H1 은 각각 서열식별번호 40, 서열식별번호 41, 서열식별번호 42에 기재된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 또는 약 95% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 3개의 CDR, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함할 수 있다. V_L2 는 각각 서열식별번호 63, 서열식별번호 64, 서열식별번호 39에 기재된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 또는 약 95% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR), CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함할 수 있다. V_H2 는 각각 서열식별번호 60, 서열식별번호 61, 서열식별번호 62에 기재된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 또는 약 95% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 3개의 CDR, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함할 수 있다.
- [0117] 특정 실시양태에서, V_L1 은 V_H1 의 N-말단에 위치한다.
- [0118] 특정 실시양태에서, V_H2 는 V_L2 의 N-말단에 위치한다.
- [0119] 특정 실시양태에서, V_L1 및 V_H1 은 각각 서열식별번호 4 및 서열식별번호 3에 기재된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0120] 특정 실시양태에서, V_L2 및 V_H2 는 각각 서열식별번호 5 및 서열식별번호 6에 기재된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0121] 특정 실시양태에서, 항-CD20 항원-결합 영역은 CD20에 특이적으로 결합하는 단일 쇄 가변 단편 (scFv)이다. 특정 실시양태에서, 항-CD19 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 scFv이다.
- [0122] 이중특이적 CAR은 하기: (a) 신호 펩티드, (b) 헌지 영역, (c) 막횡단 도메인, (d) 공동-자극 영역, 및 (e) 세포질 신호전달 도메인 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0123] 공동-자극 영역은 4-1BB (CD137), CD28, OX40, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD70, CD134, PD1, Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR, TLR2, 또는 그의 조합의 공동-자극 영역을 포함할 수 있다.
- [0124] 세포질 신호전달 도메인은 CD3ζ의 세포질 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0125] 헌지 영역은 야생형 또는 돌연변이체 Ig4, CD8, CD28, CD137, 또는 그의 조합의 헌지 영역을 포함할 수 있다.
- [0126] 막횡단 도메인은 CD8, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 또는 그의 조합의 막횡단 도메인을 포함할 수 있다.
- [0127] 특정 실시양태에서, 이중특이적 CAR은 서열식별번호 16에 기재된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 또는 약 95% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0128] 본 개시내용은 본 이중특이적 CAR을 발현하는 면역 세포를 제공한다. 면역 세포는 T 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포일 수 있다.
- [0129] 본 이중특이적 CAR을 코딩하는 핵산 또한 본 개시내용에 의해 포함된다.
- [0130] 본 개시내용은 본 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0131] 본 개시내용은 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 그를 필요로 하는 대상체에게 면역 세포를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0132] 면역 세포는 동종이계 또는 자가일 수 있다.
- [0133] 암은 혈액학적 암일 수 있다. 암은 B 세포 악성종양일 수 있다. 암은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 및/또는 다발성 골수종. The 암 may be 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발성 골수종 (MM), 만성 림프구 백혈

병 (CLL), 만성 골수형성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 미만성 거대 B 세포 림프종 (DLBCL), 또는 그의 조합일 수 있다.

[0134] 특정 실시양태에서, 이중특이적 CAR은 이중특이적 CAR의 대상체에게로의 투여 후 약 28일 이내에 대상체의 혈중 약 0.5e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 4e+06 카페/gDNA, 약 0.5e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.5e+06 카페/gDNA, 약 1e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.5e+06 카페/gDNA, 약 1.2e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.2e+06 카페/gDNA, 약 0.8e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.2e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 1.6e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.2e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 2e+06 카페/gDNA, 약 0.6e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 1.8e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.2e+06 카페/gDNA, 약 0.5e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 1.7e+06 카페/gDNA, 약 2e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.2e+06 카페/gDNA, 약 1.5e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 2e+06 카페/gDNA, 또는 약 1e+06 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.2e+06 카페/gDNA 범위의 곡선하 면적 (AUC)을 생성할 수 있다.

[0135] 특정 실시양태에서, 이중특이적 CAR은 이중특이적 CAR의 대상체에게로의 투여 후 대상체의 혈중 약 0.8e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.5e+05 카페/gDNA, 약 1e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.5e+05 카페/gDNA, 약 1e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 1.6e+05 카페/gDNA, 약 1e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.3e+05 카페/gDNA, 약 0.8e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 1.5e+05 카페/gDNA, 약 0.8e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 2e+05 카페/gDNA, 약 1e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 2e+05 카페/gDNA, 약 2e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3e+05 카페/gDNA, 약 2e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3.5e+05 카페/gDNA, 약 2e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 2.5e+05 카페/gDNA, 또는 약 1e+05 카페/ μ g 게놈 DNA (카페/gDNA) 내지 약 3e+05 카페/gDNA 범위의 최대 혈장 농도 ($C_{\text{최대}}$)를 생성할 수 있다.

[0136] 특정 실시양태에서, 이중특이적 CAR의 $T_{\text{최대}}$ (이중특이적 CAR이 $C_{\text{최대}}$ 에 도달하는 데 소요되는 시간)는 약 3일 내지 약 20일, 약 4일 내지 약 18일, 약 5일 내지 약 17일, 약 6일 내지 약 16일, 약 7일 내지 약 15일, 약 9일 내지 약 15일, 약 10일 내지 약 15일, 약 10일 내지 약 14일, 약 8일 내지 약 12일, 약 6일 내지 약 14일, 약 12일 내지 약 14일, 약 8일 내지 약 11일, 약 8일 내지 약 15일, 또는 약 10일 내지 약 14일 범위이다.

[0137] 상기 언급된 본 발명의 다양한 기술적 특징 및 (실시예에서와 같이) 이하에서 구체적으로 설명되는 다양한 기술적 특징은 본 발명의 범주 내에서 서로 조합되어 공간의 제약으로 인해 하나씩 설명될 필요가 없는 새로운 또는 바람직한 기술적 솔루션을 구성할 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

[0138] 도 1은 CD19 및 CD20을 표적화하는 조합된 키메라 항원 수용체의 구조를 보여주는 것이다. CAR의 구조는 신호펩티드 서열 ("SP"), 항원 인식 서열, 헌지 영역, 막횡단 영역, 공동-자극 인자 신호 영역, 및 CD3 ζ 신호전달 영역을 포함한다.

도 2a 및 2b는 T 세포막 표면 상 CD137의 발현 수준 (도 2a) 및 배양 상청액 중 IFN γ 의 분비 수준 (도 2b)을 보여주는 것이다. 구체적으로, 7일 배양된 1×10^5 개의 CAR-T19/20 세포를 채취하고, 각각 1:1의 비로 CD19-양성 K562-CD19+ 종양 세포주, CD20-양성 K562-CD20+ 종양 세포주, CD19 및 CD20 이중 양성 K562-CD19+CD20+ 종양 세포주, CD19 및 CD20을 자연적으로 발현하는 RAJI 종양 세포주, 및 CD19 및 CD20 이중 음성 K562 종양 세포주와 함께, 또는 종양 세포 부재하에서 18 h 동안 200 μ l GT-551 배지 중에서 배양하였다. 이어서, T 세포막 표면 상의 CD137의 발현 수준 및 배양 상청액 중의 IFN γ 의 분비 수준을 각각 검출하였다.

도 3a는 주로 공동 배양 후 상청액 중 LDH의 분비 수준을 검출함으로써 CAR-T19/20 세포의 종양 사멸 활성 검출을 보여주는 것이다. 구체적으로, CD19-양성 K562-CD19+ 종양 세포주, CD20-양성 K562-CD20+ 종양 세포주, CD19 및 CD20 이중 양성 K562-CD19+ CD20+ 종양 세포주, CD19 및 CD20을 자연적으로 발현하는 RAJI 또는 RAMOS 종양 세포주, 또는 CD19 및 CD20 이중 음성 K562 종양 세포주 1×10^4 개의 세포를 각각 도면에 제시된 바와 같은 비로 상응하는 T 세포와 함께 8 h 동안 100 μ l GT-551 배지 중에서 공동 배양하였다. 이어서, LDH의 분비 수준을 검출하였고, 본 도면은 상응하는 공동 배양 샘플에서의 LDH 방출률(%)의 통계적 분석 결과를 보여주는 것이다.

도 3b는 주로 T 세포막의 표면 상의 CD107a의 발현 수준을 검출함으로써 CAR-T19/20 세포의 종양 사멸 활성 검출을 보여주는 것이다. 구체적으로, 1×10^5 개의 CAR-T19/20 세포를 채취하고, 각각 1:2의 비로 CD19-양성 K562-CD19+ 종양 세포주, CD20-양성 K562-CD20+ 종양 세포주, CD19 및 CD20 이중 양성 K562-CD19+CD20+ 종양 세포주, CD19 및 CD20을 자연적으로 발현하는 RAJI 또는 RAMOS 종양 세포주, 및 CD19 및 CD20 이중 음성 K562 종양 세포주와 함께, 또는 종양 세포 부재하에서 4 h 동안 200 μl GT-551 배지 중에서 배양하였다. 이어서, T 세포막 표면 상의 CD137의 발현 수준을 각각 검출하였다.

도 4a는 21일 이내에 CAR-T19/20 세포를 주사맞은 마우스의 평균 체중 변화 및 평균 형광 강도 변화를 보여주는 것으로, 이는 매 7일마다 기록된 것이다.

도 4b는 3개의 마우스 군의 평균 형광 강도를 보여주는 것이다.

도 4c는 주사 후 0일째 (D0), 7일째 (D7), 14일째 (D14), 및 21일째 (D21)의 CAR-T19/20 세포를 주사맞은 마우스의 생체내 이미징을 보여주는 것이다.

도 5a는 이중특이적 TN-OF-19 CAR-T 세포가 생체내에서 CD19 특이적 CAR-T 세포보다 종양 세포를 더욱 잘 억제시키거나, 또는 사멸시킬 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

도 5b는 4개의 CAR-T 세포군 및 NT 군에서의 형광 강도 IVIS 이미징을 보여주는 것이다.

도 6a는 CD20scFv-CD19scFv rabFc의 구조를 보여주는 것이다.

도 6b는 키메라 항체가 CD19 또는 CD20, 또는 둘 모두가 있는 세포에 결합하였지만, 두 항원이 모두 결여된 세포에는 결합하지 않았다는 것을 보여주는 것으로, 이는 이중특이적 결합 도메인은 결합을 위해서는 오직 단 하나의 동족 항원만을 요구하였고, 어떤 새로운 특이적 인식 부위도 형성되지 않았다는 것을 시사하는 것이다.

도 7은 6개의 상이한 scFV 및 상이한 헌지/TM/신호전달 도메인을 갖는 16개의 CD20 특이적 CAR의 구조를 보여주는 것이다.

도 8a는 CAR-T20.1, CAR-T20.5, CAR-T20.6, CAR-T20.7, CAR-T20.8, CAR-T20.9 및 CAR-T20.10을 스크리닝하는 IFN γ 방출 검정법의 결과를 보여주는 것이며, 상기 CAR-T 중 오직 CAR-T20.9 (Leu16) 및 CAR-T20.10 (Leu16) 만이 더 높은 양성 IFN γ 방출을 보였다.

도 8b는 CAR-T20.1, CAR-T20.9, CAR-T20.10, CAR-T20.11, CAR-T20.12, CAR-T20.13, CAR-T20.14, CAR-T20.15 및 CAR-T20.16을 스크리닝하는 IFN γ 방출 검정법의 결과를 보여주는 것이다. 상기 CAR-T 중 CAR-T20.10 (Leu16) 및 CAR-T20.14 (OF)는 더 높은 양성 IFN γ 방출을 보였다.

도 8c는 CAR-T20.9, CAR-T20.12, CAR-T20.14, CAR-T20.17, CAR-T20.18, 및 CAR-T20.19를 스크리닝하는 IFN γ 방출 검정법의 결과를 보여주는 것이다. 상기 CAR-T 중 CAR-T20.14 (OF) 및 CAR-T20.19 (OF)는 더 높은 양성 IFN γ 방출을 보였다.

도 9a는 LDH 방출 검정법에 의해 세포독성에 대하여 시험된 CAR-T20.17 (Leu16 제3 세대), CAR-T20.18 (Leu16 제2 세대), CAR-T20.19 (OF 제2 세대) 세포의 결과를 보여주는 것이다.

도 9b는 NSG 마우스 연구에서 종양 성장의 생체내 억제를 보여주는 것이다. 동물에 주사된 종양 세포는 루시페라제를 발현하는 Raji이다.

도 10은 CAR039 I상 임상 연구 디자인 및 흐름도를 보여주는 것이다.

도 11은 C-CAR039 임상 결과의 요약을 보여주는 것이다.

도 12는 C-CAR039 치료 이전 및 이후의 환자의 예를 보여주는 것이다.

도 13은 환자의 말초 혈액에서의 C-CAR039의 증식 및 확장 뿐만 아니라, B 세포 고갈을 보여주는 것이다. 결과는 C-CAR008 세포가 주사 후 효과적으로 확장되었다는 것을 보여주었다. 사각형: 1×10^6 개의 CAR-T 세포/kg. 삼각형: $2 \sim 2.5 \times 10^6$ 개의 CAR-T 세포/kg. 동그라미: $4 \sim 5.0 \times 10^6$ 개의 CAR-T 세포/kg. 솔리드 기호 (사각형, 삼각형, 동그라미): CAR-T DNA 카피. 언필링된 기호 (사각형, 삼각형, 동그라미): CD19/CD20+ B 세포 수준.

도 14는 C-CAR066-NHL 연구 디자인을 보여주는 것이다.

도 15는 C-CAR066으로의 치료 이전 및 이후의 환자의 PET-CT의 예를 보여주는 것이다.

도 16a-16d: 항-CD19/CD20 이중특이적 CAR을 위한 최적의 항원 결합 도메인 확인. 도 16a는 TN-OF-19 (C-CAR039) 및 TN-19-OF의 구조를 보여주는 것이다. 도 16b는 오파투무맙 scFv에 이어서 FMC63 scFv가 탠덤으로 연결된 C-CAR039는 우수한 항-종양 활성을 갖는다는 것을 보여주는 것이다. 도 16c는 TN-OF-19 (C-CAR039), TN-OFR-19, TN-OF-19R 및 TN-OFR-19R의 구조를 보여주는 것이다. 도 16d는 C-CAR039의 우수한 항-종양 활성 및 항원 결합 도메인의 최적의 구조에의 특이성 연결을 보여주는 것이다.

도 17a는 C-CAR039의 항원 결합 도메인의 결합 특이성을 평가하는 프로세스를 보여주는 것이다. 도 17b는 CD19, CD20 및 FCGR1A는 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 중간 정도로 결합하는 것으로 확인되었다. 어떤 다른 유의한 상호 작용도 확인되지 않았다. FCGR1은 rabFc에 결합하는 것으로 보고되었다.

도 18은 C-CAR039에 대한 무진행 생존 (PFS)의 카플란 마이어(Kaplan Meyer) 추정을 보여주는 것이다.

도 19는 C-CAR039의 약동학적 성질 (PK)/약력학적 성질 (PD) 프로파일을 보여주는 것이다. 저용량 ("저"): 1×10^6 개의 CAR-T 세포/kg (체중); 중간 용량 ("중"): $2 \times 10^6 - 2.5 \times 10^6$ 개의 CAR-T 세포/kg (체중); 고용량 ("고"): $4 \times 10^6 - 5.0 \times 10^6$ 개의 CAR-T 세포/kg (체중).

도 20은 재발 환자의 말초 혈액 중의 PK/PD 프로파일 (CAR-T 확장 및 B 세포 고갈)을 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0139]

광범위하고, 집중적인 연구 후에, 본 발명자들은 예상외로 CD19 및 CD20을 동시에 표적화하는 CAR-T 세포를 수득하였다. 구체적으로, 본 발명은 신호 웨티드, 항-CD20 scFv, 항-CD19 scFv, 헌지 영역, 막횡단 영역, 및 세포내 T 세포 신호전달 영역을 포함하는, CD19 및 CD20을 동시에 표적화하는 키메라 항원 수용체를 제공한다. 또한, 다중 반복 구조를 갖는 웨티드 단편 (G4S)으로 연결된 항-CD20 scFv 및 항-CD19 scFv를 다수의 스크리닝을 통해 수득하였다. 본 발명의 CAR-T 세포는 CD19 및 CD20 항원을 둘 모두 인식하여 단일 표적 CAR-T 세포의 치료 중 항원 발현의 하향조절 또는 결실로 인한 면역 회피의 위험을 감소시킬 수 있다. 단일 항원을 표적화하는 CAR-T 세포 및 (CD19 및 CD20을 표적화하는) 다른 이중 표적 CAR-T 세포와 비교하여, 2개의 표적을 동시에 인식하는 본 발명의 CAR-T 세포는 종양 세포에 대해 더 강력한 사멸 능력, 더 적은 세포독성, 더 낮은 부작용, 더 넓은 치료 범위, 더 낮은 재발률 및 더 우수한 효능을 갖는다. 본 발명은 이에 기초하여 완성되었다.

[0140]

용어

[0141]

본 개시내용을 더 쉽게 이해할 수 있도록 먼저 일부 용어를 정의한다. 본 출원에서 사용되는 바, 본원에서 달리 명백히 언급되지 않는 한, 하기 용어들은 각각 하기에 주어진 의미를 가져야 한다. 다른 정의는 본 출원 전역에 걸쳐 설명된다.

[0142]

용어 "약"은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 특정 값 또는 조성에 대해 허용가능한 오차 범위 내의 값 또는 조성을 지칭할 수 있으며, 이는 값 또는 조성이 측정되거나 결정되는 방법에 부분적으로 좌우될 것이다.

[0143]

용어 "투여하는"은 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 척추 또는 다른 비경구 투여를 비롯한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 어느 하나를 사용하여, 예컨대, 주사 또는 주입에 의해 대상체에게 본 발명의 생성물을 물리적으로 도입하는 것을 지칭한다.

[0144]

용어 "항체" (Ab)는 항원에 특이적으로 결합하고, 디슬파이드 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L) 또는 그의 항원 결합부를 함유하는 면역글로불린, 또는 그의 항원 결합부를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 각각의 H 쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 로 약칭) 및 중쇄 불변 영역을 함유한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 함유한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본 명세서에서 V_L 로 약칭) 및 경쇄 불변 영역을 함유한다. 경쇄 불변 영역은 불변 도메인 CL을 함유한다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 명명되는, 보존성이 더욱 큰 영역 내에 산재되어 있는 상보성 결정 영역 (CDR)으로 명명되는 초가변 영역으로 추가로 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR을 함유하며, 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다.

[0145]

CD20

[0146]

항-CD19 CAR-T의 효능은 탁월하지만, 많은 연구에서 CD19 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포 요법에 여전히 많은 문제가 있는 것으로 밝혀졌다. 여전히 일부 환자에서는 치료 결과가 불량하고, 쉽게 재발되고 있다. 이는 항원 회피에 대한 종양 세포의 감수성을 포함한다.

[0147]

CD19 CAR-T 항원의 회피를 방지하기 위해, 본 발명자들은 CD19 항원이 회피하고, 종양 세포에서 발현되지 않을 때, CD20이 인식되어 생체내에서 종양 세포를 제거할 수 있도록, CD19 및 CD20을 둘 모두를 표적화하는 조합된 이중특이적 CAR (즉, BICAR)을 디자인한다.

[0148]

CD20은 항-CD19 CAR-T 치료 후 일부 CD19 음성 환자를 포함하는, 대부분의 B 세포 급성 림프모구성 백혈병 환자에서 발현된다. CD20은 글리코실화된 단백질이며, 최초로 확인된 B 세포막 마커이다. CD20은 또한 B1으로도 알려져 있으며, MS4A 유전자에 의해 코딩된다.

[0149]

CD20 분자는 4개의 막횡단 소수성 영역을 가지고 있으며, N-말단 및 C-말단은 세포질 측에 위치하여 세포 외부에 2개의 폐쇄형 루프를 형성하며, 이는 각각 각각 큰 루프 및 작은 루프로 명명된다. CD20은 정상 및 암성 B 세포의 95% 초과에서 특이적으로 발현된다. 이 세포는 프리-B 세포 단계 및 후속 발생 단계에 있으며, CD20은 세포가 형질 세포로 분화될 때까지 발현을 중단한다. 본 발명은 B 세포 악성종양의 면역요법을 위한 또 다른 표적으로서 CD20을 사용한다.

[0150]

CD19 및 CD20을 표적화하는 이중특이적 키메라 항원 수용체

[0151]

세포 면역요법은 매우 효과적인 신흥 종양 치료 모델이며, 암에 대한 새로운 유형의 자가면역 치료법이다. 환자로부터 수득한 면역 세포를 생명공학 및 생물학적 제제를 이용하여 시험관내 배양 및 증폭시킨 후, 이어서, 세포를 다시 환자에게 주입하여 신체의 자가면역 기능을 자극 및 증강시켜 종양 치료 목적을 달성하는 방법이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 효율성을 증가시키고, 부작용을 감시하기 위해 새로운 세포 면역 요법을 개발하기 위해 노력해 왔다.

[0152]

본 발명은 1차 인간 T 세포에 효과적으로 통합될 수 있고, T 세포가 활성화되었을 때, CD19 및 CD20을 동시에 표적화할 수 있는 합리적이고 최적화된 단일 쇄 디자인 및 시스템, 즉, 조합된 이중특이적 CAR을 제안한다. 본 발명의 CAR-T 세포는 2개의 항원(CD19 및 CD20)을 인식할 수 있다. 본 발명은 항원 회피를 방지하기 위한 매우 효과적인 잠재적인 방법을 제공한다.

[0153]

본 발명은 CD19 및 CD20을 동시에 표적화하는 CAR을 사용한다. 단일 항원을 표적화하는 CAR과 비교하여 친화성은 증진되어 있고, T 세포의 활성은 증가되어 있고, 표적은 상가적 또는 상승적 효과를 갖는다. 추가로, 종양 세포에서 CD19 및 CD20의 불균등한 발현 수준으로 인해 이중 표적 CAR-T 요법은 범위가 더 넓다. 종양 세포 표면 상의 CD19 및 CD20을 동시에 표적화하는 CAR-T는 단일 표면 항원의 하향조절 또는 결실로 인한 항원 회피 가능성을 감소시킬 수 있다.

[0154]

이중특이성은 동일한 CAR이 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하고, 면역인식할 수 있고, CAR이 항원 중 어느 하나에 결합함으로써 면역 반응을 생성할 수 있다는 것을 의미한다.

[0155]

본 발명의 CD19 및 CD20 이중특이적 CAR은 단일 구조를 가지며, 항-CD19 및 항-CD20 scFv를 포함한다. 여기서 CAR은 CD19 scFv 및 CD20 scFv를 포함하고, CD19 scFv 및 CD20 scFv의 아미노산 서열, 시퀀싱 및 헌지가 그의 기능에 영향을 미치는 주요 인자이다.

[0156]

구체적으로, 본 발명의 키메라 항원 수용체 (CAR)는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포내 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 표적-특이적 결합 요소 (항원 결합 도메인으로도 또한 공지)를 포함한다. 세포내 도메인은 공동-자극 신호전달 영역 및 ζ 쇄를 포함한다. 공동-자극 신호전달 영역은 공동-자극 분자를 포함하는 세포내 도메인의 일부를 지칭한다. 공동-자극 분자는 항원 수용체 또는 그의 리간드보다는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 세포 표면 분자이다.

[0157]

링커는 CAR의 세포외 도메인과 막횡단 도메인 사이, 또는 CAR의 세포질 도메인과 막횡단 도메인 사이에 도입될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "링커"는 일반적으로 막횡단 도메인을 폴리펩티드 쇄의 세포외 도메인 또는 세포질 도메인에 연결하는 역할을 하는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 링커는 0-300개의 아미노산, 바람직하게, 2-100개의 아미노산, 가장 바람직하게는 3-50개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0158]

본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에서 제공되는 CAR의 세포외 도메인은 CD19 및 CD20을 표적화하는 항

원 결합 도메인을 포함한다. 본 발명의 CAR이 T 세포에서 발현되는 경우, 항원 인식은 항원 결합 특이성을 기반으로 수행될 수 있다. CAR이 그의 연관된 항원에 결합하는 경우, 이는 종양 세포에 영향을 미쳐 종양 세포가 성장하지 못하게 하거나, 또는 사멸되거나, 그렇지 않으면 영향을 받아 환자의 종양 부담이 줄어들거나, 제거되게 한다. 항원 결합 도메인은 바람직하게 공동-자극 분자 및 ζ 쇄 중 하나 이상으로부터의 세포내 도메인에 융합된다. 바람직하게, 항원 결합 도메인은 4-1BB 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인의 조합의 세포내 도메인과 융합된다.

[0159] 본원에서 사용되는 바, "항원 결합 도메인" 및 "단일 쇄 항체 단편"은 항원-결합 활성을 갖는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, 또는 단일 Fv 단편을 지칭한다. Fv 항체는 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 함유하지만, 불변 영역은 갖지 않는다. Fv 항체는 모든 항원-결합 부위를 갖는 가장 작은 항체 단편을 갖는다. 일반적으로, Fv 항체는 또한 V_H와 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 포함하고, 항원 결합에 필요한 구조를 형성할 수 있다. 항원 결합 도메인은 대개 scFv (단일 쇄 가변 단편)이다. scFv의 크기는 전형적으로 완전한 항체의 1/6이다. 단일 쇄 항체는 바람직하게, 뉴클레오티드 쇄에 의해 코딩된 아미노산 쇄 서열이다. 본 발명의 바람직한 실시양태로서, scFv는 CD19 및 CD20을 특이적으로 인식하는 항체를 특이적으로 인식하는 항체를 포함한다.

[0160] 헌지 영역 및 막횡단 영역 (막횡단 도메인)에 대해, CAR은 CAR의 세포외 도메인에 융합된 막횡단 도메인을 포함하도록 디자인될 수 있다. 한 실시양태에서, CAR의 도메인 중 하나와 자연적으로 회합된 막횡단 도메인이 사용된다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 이러한 도메인이 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에 결합하는 것을 방지함으로써 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하도록 선택되거나, 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다.

[0161] 본 발명의 CAR의 세포내 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3 ζ의 신호전달 도메인을 포함한다.

[0162] 바람직하게, 본 발명의 CAR 구조는 차례로 신호 웨티드 서열 (리더 서열로도 또한 공지), 항원 인식 서열 (항원-결합 도메인), 헌지 영역, 막횡단 영역, 공동-자극 인자 신호 영역, 및 CD3제타 신호전달 영역 (ζ 쇄 부분)을 포함한다. 연결 순서는 도 1에 제시된 바와 같다.

[0163] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 CAR은 TN-LEU-19이다. CD20을 표적화하는 항원 결합 도메인은 Leu16 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 중쇄 서열 (서열식별번호 1) 및 경쇄 (VL) 서열 (서열식별번호 2)을 포함한다.

[0164] Leu16 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 중쇄 서열 (V_H):

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPGQGLEWIGAIYP
GNGDTSYNOKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARS**NYYGSSYWFFD**
VWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

[0166] LEU-VH-CDR1: 서열식별번호 1, 위치 31-35;

[0167] LEU -VH-CDR2: 서열식별번호 1, 위치 50-66;

[0168] LEU -VH-CDR3: 서열식별번호 1, 위치 99-111.

[0169] Leu16 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 경쇄 서열 (V_L):

DIVLTQSPAILSASPGEKVMT**CASSSVNYMD**WYQKKPGSSPKPWIY**ATSNLAS**
 GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC**QQWSFNPPTFGGGT**KLEIK (SEQ ID NO:

[0170] 2)

[0171] LEU-VL-CDR1: 서열식별번호 2, 위치 24-33;

[0172] LEU -VL-CDR2: 서열식별번호 2, 위치 49-55;

[0173] LEU -VL-CDR3: 서열식별번호 2, 위치 88-96.

Leu16 영역	서열	잔기	길이
HFR1	EVQLQQSGAELVKPGASVAKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 46)	1 - 30	30
V _H -CDR1	SYNMH (SEQ ID NO: 47)	31 - 35	5
HFR2	WVKQTPGQGLEWIG (SEQ ID NO: 48)	36 - 49	14
V _H -CDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 49)	50 - 66	17
HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSESDADYYCAR (SEQ ID NO: 50)	67 - 98	32
V _H -CDR3	SNYYGSSYWFFDV (SEQ ID NO: 51)	99 - 111	13
HFR4	WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 52)	112 - 122	11
Leu16 V _H			122

[0174]

Leu16 영역	서열	잔기	길이
LFR1	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC (SEQ ID NO: 53)	1 - 23	23
V _L -CDR1	RASSSVNYMD (SEQ ID NO: 54)	24 - 33	10
LFR2	WYQKKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO: 55)	34 - 48	15
V _L -CDR2	ATSNLAS (SEQ ID NO: 56)	49 - 55	7
LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC (SEQ ID NO: 57)	56 - 87	32
V _L -CDR3	QQWSFNPPPT (SEQ ID NO: 58)	88 - 96	9
LFR4	FGGGTKEIK (SEQ ID NO: 59)	97 - 106	10
Leu16 V _L			106

[0175]

[0176] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 CAR은 TN-OF-19이다. CD20을 표적화하는 항원 결합 도메인은 오파투무맙 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 중쇄 서열 (서열식별번호 3) 및 경쇄 서열 (서열식별번호 4)을 포함한다.

[0177] 오파투무맙 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 중쇄 서열 (VH):

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTF**NDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISW**
NSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK**DIQYGNYYYYGMD**
VWQGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 3)

[0178]

[0179] OF-VH-CDR1: 서열식별번호 3, 위치 30-35. OF-VH-CDR1의 서열은 NDYAMH (서열식별번호 40)이다.

[0180]

[0180] OF-VH-CDR2: 서열식별번호 3, 위치 50-66. OF-VH-CDR2의 서열은 TISWNSGSIGYADSVKG (서열식별번호 41)이다.

[0181]

[0181] OF-VH-CDR3: 서열식별번호 3, 위치 99-111. OF-VH-CDR3의 서열은 DIQYGNYYYYGMDV (서열식별번호 42)이다.

[0182] 오파투무맙 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 경쇄 서열 (VL):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSSYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**DASN RAT**
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYC**QOR SNWPITFGQGTRLEIK** (SEQ ID NO: 4)

[0183]

[0184] OF-VL-CDR1: 서열식별번호 4, 위치 24-34. OF-VL-CDR1의 서열은 RASQSVSSYLA (서열식별번호 43)이다.

[0185]

[0185] OF-VL-CDR2: 서열식별번호 4, 위치 50-56. OF-VL-CDR2의 서열은 DASN RAT (서열식별번호 44)이다.

[0186]

[0186] OF-VL-CDR3: 서열식별번호 4, 위치 89-97. OF-VL-CDR3의 서열은 QOR SNWPIT (서열식별번호 45)이다.

[0187]

[0187] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 CAR에서 CD19를 표적화하는 항원-결합 도메인은 FMC63 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 경쇄 (V_L) 서열 (서열식별번호 5) 및 중쇄 (V_H) 서열 (서열식별번호 6)을 포함한다.

[0188] FMC63 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 경쇄 (V_L)의 아미노산 서열:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVP
SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQQNTLPYTFGGGTKEIT(SEQ ID NO: 5)

[0189] FMC63-VL-CDR1: 서열식별번호 5, 위치 24-34. FMC63-VL-CDR1의 서열은 RASQDISKYLN (서열식별번호 63)이다.

[0190] FMC63-VL-CDR2: 서열식별번호 5, 위치 50-56. FMC63-VL-CDR2의 서열은 HTSRLHS (서열식별번호 64)이다.

[0191] FMC63-VL-CDR3: 서열식별번호 5, 위치 89-97. FMC63-VL-CDR3의 서열은 QQQNTLPYT (서열식별번호 39)이다.

[0192] FMC63 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 경쇄 (V_L)의 뉴클레오티드 서열:

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtccccatca 180
aggttcagtg gcagttgggtc tggAACAGAT tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
gaagatattg ccacttaacctt ttgcacaaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcgagg 300
gggaccaagc tggagatcac a 321

(SEQ ID NO: 21)

[0193] FMC63 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 중쇄 (V_H)의 아미노산 서열:

EVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVVIWGSE
TTYYNSALKSRLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO: 6)

[0194] FMC63-VH-CDR1: 서열식별번호 6, 위치 31-35. FMC63-VH-CDR1의 서열은 DYGVS (서열식별번호 60)이다.

[0195] FMC63-VH-CDR2: 서열식별번호 6, 위치 50-65. FMC63-VH-CDR2의 서열은 VIWGSETTYNSALKS (서열식별번호 61)이다.

[0196] FMC63-VH-CDR3: 서열식별번호 6, 위치 98-109. FMC63-VH-CDR3의 서열은 HYYGGSYAMDY (서열식별번호 62)이다.

[0197] FMC63 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 영역의 중쇄 (V_H)의 뉴클레오티드 서열:

gaggtgaaac tgcaaggagtc aggacctggc ctgggtggcgc ctcacagag cctgtccgtc 60
acatcgactg ttcagggggt ctcattaccc gactatgggt taagctggat tcgccagcct 120
ccacggaaagg gtctggagtg gctggggat atatgggta gtgaaaccac atactataat 180
tcagctctca aatccagact gaccatcatc aaggacaact ccaagagcca agtttccta 240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatattact actgtgccaac acattattac 300
tacggtggta gctatgctat ggactactgg ggcacaggaa cctcagtcac cgtctccatc 360

(SEQ ID NO: 22)

[0198] 구체적으로, 본 발명의 CAR 중의 다른 요소들의 서열은 하기와 같다:

[0199] 리더 서열은 CD8 항원의 리더 서열이다:

[0200] MALPTALLPLALLHAARP (서열식별번호 8).

[0201] 단일 쇄 가변 영역의 중쇄와 경쇄 사이의 링커 서열 (즉, 가요성 링커 I)은 하기와 같다:

[0202] CD20 scfv의 V_L 과 V_H 사이의 링커의 아미노산 서열:

[0203] GSTSGGGSGGGSGGGSS (서열식별번호 19)

[0204] CD19 scFv의 V_H 와 V_L 사이의 링커의 아미노산 서열:

[0205] GSTSGSGKPGSGEGSTKG (서열식별번호 20).

- [0210] 헌지 영역은 짧은 형태의 IgG4 헌지의 서열로부터 선택된다:
- [0211] ESKYGGPPCPPCP (서열식별번호 9).
- [0212] 막횡단 영역은 CD8 (CD8TM) 또는 CD28 (CD28TM) 항원의 막횡단 영역 서열이다:
- [0213] CD8TM: IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (서열식별번호 10)
- [0214] CD28TM: MFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAIFIIFWV (서열식별번호 11).
- [0215] 공동-자극 인자 신호 영역은 4-1BB 또는 CD28 세포질 신호전달 모티프의 서열로부터 유래된 것이다:
- 4-1BB: KRGRKKLLYIFKQPFMMPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 12)
- CD28: RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 13)
- [0216]
- [0217] CD3 ζ의 신호전달 영역은 TCR 복합체 중 CD3 ζ의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)의 서열로부터 유래된 것이다:
- RVKFSSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO: 14)
- [0218]
- [0219] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에서 구축된 두 CAR의 완전한 핵산 서열 및 아미노산 서열은 하기와 같다:
- [0220] TN-OF-19의 완전한 핵산 서열은 하기와 같다:
- ATGGCCTTACCACTGACCGCCCTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC
GCCAGGCCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGCTCCAGGG
GAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTG
GTACCAACAGAACCTGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAG
GGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCT
CACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTATTACTGTCAGCAGCGTAG
CAACTGGCCGATCACCTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAGGCAGTACTA
GCGGTGGTGGCTCCGGGGCGGTTCCGGTGGGGCGGCAGCAGCGAAGTGCAGCTG
- [0221]

GTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
 GCCCTGGATTCACCTTAATGATTATGCCATGCACTGGTCCGGCAAGCTCCAGGG
 AAGGGCCTGGAGTGGTCTCAACTATTAGITGAATAGTGGTCCATAGGCTATGCG
 GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACGCTTGTA
 TCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTGTATTACTGTGCAAAAG
 ATATACTAGTACGGCAACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGCCAAGGGACACG
 GTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGATCCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCC
 TGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGCGTGA
 GCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGCAGCCCCCAGGAAGGGCTGGAA
 TGGCTGGCGTGATCTGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGGCCCTGAAGAG
 CCGGCTGACCACATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACA
 GCCTGCAGACCGACGACCCGACATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACGGC
 GGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCG
 CAGCACCTCCGGCAGCGCAAGCCTGGCAGCGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAC
 ATCCAGATGACCCAGACCACCTCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGCGACCGGGTGAC
 CATCAGCTGCCGGGCCAGCAGGACATCAGCAAGTACCTGAECTGGTATCAGCAGA
 AGCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGC
 GTGCCAGCCGGTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCC
 AACCTGGAACAGGAAGATATGCCACCTACTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCC
 CTACACCTTGGCGCGGAACAAAGCTGAAATCACCAGAGCAAGTACGGACCGC
 CCTGCCCTGCCCCTGCTCATCTTGGTGAACAGGGCAGAA
 GCTACAGCCTGCTGGTACCGTGGCTCATCTTGGTGAACAGGGCAGAA
 AGAAACTCCTGTATATATTCAAACACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
 AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAAC
 CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCAGAATCA
 GCTGTACAACGAGCTGAACCTGGCAGAAGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGC
 GGAGAGGCCGGGACCCCTGAGATGGCGCAAGCCTCGCGGAAGAACCCCCAGGA
 AGGCCTGTATAACGAACCTGAGAAAGACAAGATGCCAGGGCTACAGCAGGATCG
 GCATGAAGGGCGAGCGGAGGCAGGGCAAGGCCACGACGCCCTGTATCAGGCCT
 GTCCACCGCCACCAAGGATAACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCAA
 GG (SEQ ID NO:18)

[0222]

[0223] TN-OF-19의 완전한 아미노산 서열은 하기와 같다:

MALPV TALLPL ALLLHAARPEIVLTQSPATLS PGERATLSCRAS QSVSSY LAW
 YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQR SNWPI
 TFGQGTRLEIKGSTGGGGGGGGSEVQLVESGGLVQPGRS RLSCAASGFT FN
 DYAMHWVRQAPKGKLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKSLY LQMNSLR
 AEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVSSGGGGSEVKLQESGP GLVAPSQS
 LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW GSETTYYNSALKSRLTII KDN SKSQ
 VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT STVSSG STSGSGKPGS GEG
 STKGDIQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISK YLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS RLHS
 GVP SRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ QNTPYTFGGGT KLEITES KYGPP CPP
 CPM FWVLVVGGVLACYSLLTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGC
 SCRFPEEEEGGCELRVFKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELN LGRRE EYDVLDKRR GRDPE
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD GLYQGLSTATKDTY
 DALHMQALPPR (SEQ ID NO: 16)

[0224]

[0225]

TN-LEU-19의 완전한 핵산 서열은 하기와 같다:

```

ATGGAGACAGACACACTCTGCTATGGGTGCTGCTGCTGGGTTCCAGGTTCC
ACAGGTGACATTGTGCTGACCCAATCTCAGCTATCCTGTCTGCATCTCAGGGAG
AAGGTACAATGACTTGCAAGGCCAGCTCAAGTGTAAATTACATGGACTGGTACCA
GAAGAACCCAGGATCCTCCCCAAACCTGGATTATGCCACATCCAACCTGGCTTC
TGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGCTGGGACCTCTTACTCTCACAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTTTAAT
CCACCCACGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAAAGGCAGTACTAGCGGTGG
TGGCTCCGGGGCGGTTCCGGTGGGGCGGCAGCAGCGAGGTGCAGCTGCAGCAGT
CTGGGGCTGAGCTGGTAAGCCTGGGCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTG
GCTACACATTACCAAGTTACAATATGCACTGGTAAAGCAGACACCTGGACAGGGC
CTGGAATGGATTGGAGCTATTATCCAGGAAATGGTGTAACTTCCTACAATCAGAAG
TTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCAGCACAGCCTACATGCA
GCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGACTATTACTGTGCAAGATCTAATTA
TTACGGTAGTAGCTACTGGTCTTCGATGTCTGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGT
CTCCTCAGGAGGTGGATCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCAGGCTGGCCTGGCTGG
TGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCC

```

[0226]

```

GAECTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGAAGGGCTGGAATGGCTGGG
CGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGGCCGGCTGA
CCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAG
ACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACCGCGGCAGCTA
CGCCATGGACTACTGGGCCAGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCT
CCGGCAGCGCAAGCCTGGCAGCGCGAGGGCAGCAGCAAGGGCAGATCCAGAT
GACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGCGACCGGGTGACCATCAGCT
GCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACGGTATCAGCAGAAGCCGAC
GGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAG
CCGGTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCAACCTGGA
ACAGGAAGATATGCCACCTACTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTT
TGGCGGCCGAACAAAGCTGAAATCACCGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGGCCCC
CTTGCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGCGGAGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCC
TGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCC
TGTATATATTCAAACAAACCATTATGAGACCAAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT
GGCTGTAGCTGCCATTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACCTGCGGGTGAA
GTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCAGAATCAGCTGTACA
ACGAGCTGAACCTGGCAGAAGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGG
CCGGGACCCCTGAGATGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCCAGGAAGGCCTGT
ATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCGAGGCCTACAGCGAGATCGGATGAA
GGCGAGCGGAGGCAGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCG
CCACCAAGGATAACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGGCCCAAGG(SEQ ID
NO:17)

```

[0227]

[0228]

TN-LEU-19의 완전한 아미노산 서열은 하기와 같다:

```
METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVNMDWYQK  
KPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGT  
KLEIKGSTSGGGSGGGGGSSEVQLOQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH  
WVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAD  
YYCARNSYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV  
SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMN  
SLQTDDTAIYYCAKHYYYYGSYAMDYWGQGTSVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIQ  
MTQTTSSLSASLGDRVTSRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS  
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNLPHYTFGGGTKEITESKYGPPCPCPMFWVLVVVGG  
VLACYSLLTVAFIIFWVVKRGRKKLYIFKQPFMRPVQTTQEEGCSRFPEEEEGGCEL  
RVKFSSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLKDERRGRDPEMGKPRRKNPQEG  
LYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SE
```

Q ID NO:15)

[0229]

본 발명의 BICAR의 디자인은 하기 이점을 갖는다:

[0230]

첫째, CD19 및 CD20은 대부분의 악성 B 세포 종양에서 발현한다. 둘째, 일반적으로, T 세포 인식 능력을 증가시키기 위해 CAR 구조를 확장할 때, 종종 역표적화 증가, 세포독성 증가, 부작용 증가와 같은 문제에 봉착하게 된다. 그러나, CD19 및 CD20은 모두 동일한 종양 독성 곡선을 가진 B 세포에서만 발현되기 때문에 이는 해당되지 않는다. 마지막으로, B 세포에서 CD19 및 CD20의 발현은 B 세포의 생존을 촉진시킬 수 있다. 또한, 치료 중 두 항원의 손실은 가능성성이 매우 낮은 이벤트이다. 따라서, CD19 및 CD20을 표적화하는 것은 악성 B 세포의 항원 회피의 효과적인 예방을 제공할 것으로 기대된다.

[0231]

BICAR은 CD19 또는 CD20의 단일 CAR과 비교하여, 하기와 같은 이점을 갖는다:

[0232]

첫째, 2개의 독립적인 CAR을 발현하는 것과 비교하여, 단일 T 세포에서 BICAR을 발현할 때, DNA 풋프린트는 유의하게 감소된다 (DNA 길이는 40%만큼 감소). 구조의 크기 및 길이는 바이러스 벡터의 패키징 및 형질도입 효율에 상당한 영향을 미치는 바, 임상 효능에 직접적인 영향을 미칠 수 있다. 둘째, 2개의 상이한 단일 CAR의 혼합물과 비교하여, BICAR은 치료 비용을 크게 절감하고 (BICAR은 추가적인 부담 없이 현재 T 세포 생산 프로세스와 완전히 호환가능), 임상 치료율을 증가시킬 수 있다. 마지막으로, CD19 및 CD20은 많은 임상 연구에서 검증되었으며, 비교적 안전하다.

[0233]

본 발명에서, 본 발명자들은 CD19 마우스 유래 모노클로날 항체 FMC63의 서열 및 CD20 마우스 유래 모노클로날 항체 1eu-16 및 오파투무맙의 서열에 기초하여 CD19 및 CD20을 표적화하는 2가지 유형의 키메라 항원 수용체 구조 (TN-LEU-19, TH-OF-19)를 구축하였다. 본 발명자들은 1차 T 세포에서 상기 두 키메라 항원 수용체의 발현 수준, 시험관내 활성화 능력 및 종양 세포 사멸 효능의 분석 및 확인을 완료하였다. 마지막으로, TN-LEU-19 또는 TH-OF-19 키메라 항원 수용체로 변형된 T 세포는 시험관내에서 사멸시킬 수 있고, 생체내에서 CD19 및 CD20 양성 항원을 보유하는 악성 종양을 제거할 수 있는 강력한 능력을 갖고, 오파투무맙이 1eu16보다 더 우수한 것으로 밝혀졌다. 이는 CD19 및 CD20-양성 백혈병 및 림프종의 치료에서 CAR-T의 임상 적용을 위한 새롭고 효과적인 방법 및 제제를 제공한다.

[0234]

본 발명은 단일-특이적 및 이중-특이적 CAR을 디자인하고, 최적화하였다. 상기 CAR은 CD19 또는 CD20을 발현하는 B 세포 악성종양에 대해 강력한 사멸 능력을 가지고 있다. BICAR을 통해 단일 T 세포 생성물은 B 세포 백혈병 및 림프종과 연관된 임상적으로 검증된 두 항원을 표적화할 수 있고, 이로써, 결국에는 단일 항원의 손실 또는 회피에 기인하는 종양 재발의 위험을 감소시킬 수 있다. 본 발명은 새로운 BICAR의 디자인에서 추가로 사용될 수 있으며, 이로써, 항원의 적용 가능성을 증가시키고, 암에 대한 T 세포 요법의 효능을 증가시킬 수 있다.

[0235]

키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포)

[0236]

본원에서 사용되는 바, "CAR-T 세포," "CAR-T," "CART," "본 발명의 CAR-T 세포"라는 용어는 모두 본 발명의 제4 측면의 CD19 및 CD20, 둘 모두를 표적화하는 CAR-T 세포를 지칭한다. 구체적으로, CAR-T 세포의 CAR 구조는 항-CD19 scFv, 항-CD20 scFv, 헌지 영역, 막횡단 영역, 및 세포내 T 세포 신호전달 영역을 차례로 포함하며, 여기서 항-CD20 scFv 및 항-CD19 scFv는 다중 반복 구조 (G4S)를 갖는 웹티드로 연결된다. 단일 항원을 표적화

하는 CAR-T와 비교하여 2개의 표적을 동시에 인식하는 CAR-T 세포가 더 치명적이고, 치료 범위가 더 넓다.

[0238] 벡터

[0239] 원하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은, 예컨대, 표준 기술을 이용하여 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝하거나, 이를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 유전자를 유도하거나, 또는 이를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리시킴으로써 관련 기술분야에 공지된 재조합 방법을 이용하여 수득될 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자는 합성적으로 생성될 수 있다.

[0240] 본 발명은 또한 본 발명의 발현 카세트가 삽입된 벡터를 제공한다. 예컨대, 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스로부터 유래된 벡터는 트랜스진의 장기적이고 안정적인 통합 및 말 세포에서의 그의 증식을 허용하므로 장기적 유전자 전달을 달성하는 데 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 예컨대, 간세포와 같은 비-증식 세포를 형질도입할 수 있다는 점에서 예컨대, 뮤린 백혈병 바이러스와 같은 종양-레트로바이러스로부터 유래되는 벡터보다 유리하다. 그들은 또한 면역원성이 낮다는 이점이 있다.

[0241] 간략하게 요약하면, 본 발명의 발현 카세트 또는 핵산 서열은 전형적으로 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 발현 벡터에 도입된다. 벡터는 진핵생물에서의 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 원하는 핵산 서열의 발현 조절에 유용한 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열 및 프로모터를 함유한다.

[0242] 본 발명의 발현 구축물은 또한 표준 유전자 전달 프로토콜을 이용하여 핵산 면역 및 유전자 요법에 사용될 수 있다. 유전자 전달 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예컨대, 미국 특허 번호 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466 (그의 전문이 본원에서 참조로 포함)을 참조한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.

[0243] 핵산은 많은 유형의 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드를 포함하나, 이에 제한되지 않는 벡터로 클로닝될 수 있다. 특히 관심있는 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터 및 시퀀싱 벡터를 포함한다.

[0244] 추가로, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)] 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기술되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능하는 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선별가능한 마커를 함유한다 (예컨대, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 US 특허 번호 6,326,193).

[0245] 포유동물 세포로의 유전자 전달을 위해 다수의 바이러스 기반 시스템이 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자를 관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 벡터에 삽입하고, 레트로바이러스 입자에 패키징할 수 있다. 이어서, 재조합 바이러스를 단리하고, 생체내 또는 생체외에서 대상체의 세포로 전달할 수 있다. 많은 레트로바이러스 시스템이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 많은 아데노바이러스 벡터가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.

[0246] 추가의 프로모터 요소, 예컨대, 인핸서가 전사 개시 빈도를 조절한다. 전형적으로, 비록 최근 다수의 프로모터 또한 개시 부위의 하류에 기능성 요소를 함유하는 것으로 밝혀졌지만, 이들은 개시 부위의 30-110 bp 상류 영역에 위치된다. 프로모터 요소 사이의 간격은 빈번하게 가요성인 바, 요소가 반전되거나, 서로에 대해 이동되는 경우, 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소를 시작하기 전에 50 bp 간격으로 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소가 협력적으로 또는 독립적으로 작용하여 전사를 활성화시킬 수 있는 것으로 보인다.

[0247] 적합한 프로모터의 하나의 예는 즉시 초기 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 그에 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장 성장 인자-1α (EF-1α)이다. 그러나, 시미안 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 앱스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 즉시 초기 프로모터, 라우스육종 바이러스 프로모터 뿐만 아니라, 예컨대, 제한 없이, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 혜모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나제 프로모터와 같은 인간 유전자 프로모터를 포함하나, 이에

제한되지 않는 다른 구성적 프로모터 서열도 사용될 수 있다. 추가로, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용에 제한되지 않아야 하며, 유도성 프로모터도 본 발명의 일부로 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 발현이 요구될 때, 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 작동을 개시시키거나, 또는 발현이 요구되지 않을 때에는 발현 작동을 종결시키는 문자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오네인 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라시클린 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0248] CAR 폴리펩티드 또는 그의 일부의 발현을 평가하기 위해, 세포에 도입될 발현 벡터는 또한 선별가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질감염 또는 감염되기를 원하는 세포 집단으로부터 발현 세포의 확인 및 선택을 용이하게 할 수 있다. 다른 측면에서, 선별가능한 마커는 별도의 DNA 부분에 운반될 수 있고, 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선별가능한 마커 및 리포터 유전자는 모두 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열과 플랭킹될 수 있다. 유용한 선별가능한 마커는, 예를 들어, 항생제-내성 유전자, 예컨대, neo 등을 포함한다.

[0249] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고, 조절 서열의 기능성을 평가하는 데 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나, 발현되지 않고, 예컨대, 효소 활성과 같은 다소 쉽게 검출할 수 있는 특성에 의해 발현이 나타나는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용 세포에 도입된 후 적합한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제를 코딩하는 유전자, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 포함할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82]). 적합한 발현 시스템은 널리 공지되어 있으며, 공지된 기술을 이용하여 제조되거나, 상업적으로 수득될 수 있다. 일반적으로, 가장 높은 수준의 리포터 유전자 발현을 나타내는 최소 5' 플랭킹 영역을 갖는 구축물이 프로모터로 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결되고, 프로모터-유도된 전사를 조정하는 능력에 대해 작용제를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0250] 유전자를 세포에 도입하고, 발현하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 발현 벡터의 맥락에서, 벡터는 관련 기술분야의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예컨대, 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포에 쉽게 도입될 수 있다. 예컨대, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다.

[0251] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생성하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)]를 참조한다. 숙주 세포에 폴리뉴클레오티드를 도입하는 바람직한 방법은 인산칼슘 형질감염이다.

[0252] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 특히, 레트로바이러스 벡터는 포유동물, 예컨대, 인간 세포에 유전자를 삽입하는 데 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 랜티바이러스, 폭스바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0253] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 화학적 수단은 예컨대, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미세구, 비드, 및 수중유 에멀젼, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포솜을 포함한 지질-기반 시스템과 같은 콜로이드 분산 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜 (예컨대, 인공막 소포체)이다.

[0254] 비-바이러스 전달 시스템이 사용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제제의 사용은 핵산을 (시험관내, 생체외 또는 생체내에서) 숙주 세포에 도입하기 위해 고려된다. 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 회합될 수 있다. 지질과 회합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되어 있거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 모두와 회합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 포획되거나, 리포솜과 복합체를 형성하거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질에 혼탁물로 함유되거나, 미셀과 함유 또는 복합체를 형성하거나, 다르게는 지질과 회합된다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 회합 조성물을 용액의 어떠한 특정 구조에도 제한되지 않는다. 예를 들어, 그들은 미셀과 같은 이중층 구조에 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 그들은 또한 단순히 용액에 산재되어 크기 또는 형상이 규일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수

있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 소적 뿐만 아니라, 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체, 예컨대, 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜 및 알데하이드를 함유하는 화합물 부류를 포함한다.

[0255] 한 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

제제

[0257] 본 발명은 본 발명의 제4 측면의 CAR-T 세포, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제제는 액체 제제이다. 바람직하게, 제제는 주사제이다. 바람직하게는, 제제 중 CAR-T 세포의 농도는 1×10^3 - 1×10^8 개의 세포/ml, 더욱 바람직하게, 1×10^4 - 1×10^7 개의 세포/ml이다.

[0258] 한 실시양태에서, 제제는 예컨대, 중성 완충처리된 염수, 포스페이트 완충처리된 염수 등과 같은 완충제; 예컨대, 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨과 같은 탄수화물; 단백질; 예컨대, 글리신과 같은 폴리펩티드 또는 아미노산; 항산화제; 예컨대, EDTA 또는 글루타티온과 같은 칼레이트제; 애주번트 (예컨대, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 제제는 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제제화된다.

치료 적용

[0260] 본 발명은 본 발명의 발현 카세트를 코딩하는 렌티바이러스 벡터 (LV)로 형질도입된 세포 (예컨대, T 세포)를 사용하는 치료 적용을 포함한다. 형질도입된 T 세포는 종양 세포 마커 CD19 및 CD20을 표적화하고, T 세포를 시너지적으로 활성화하고, T 세포 면역 반응을 일으켜 종양 세포에 대한 사멸 효율을 크게 증가시킬 수 있다.

[0261] 따라서, 본 발명은 또한 포유동물에게 본 발명의 CAR-T 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 자극시키는 방법을 제공한다.

[0262] 한 실시양태에서, 본 발명은 자가 환자 (또는 이종 공여자)로부터의 T 세포가 단리되고, 활성화되고, 유전자조작으로 변형되어 CAR-T 세포를 생성한 후, 이어서, 동일한 환자에게 주사되는 한 부류의 세포 요법을 포함한다. 이러한 방식으로 이식편 대 속주 질환이 일어날 가능성은 극히 낮으며, 항원은 비-MHC-제한된 방식으로 T 세포에 의해 인식된다. 추가로, 하나의 CAR-T는 항원을 발현하는 모든 암을 치료할 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR-T 세포는 생체내에서 복제할 수 있으며, 이로써, 장기간 지속될 수 있고, 그에 따라 종양 제어를 지속적으로 진행할 수 있다.

[0263] 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR-T 세포는 강건한 생체내 T 세포 확장을 겪을 수 있고, 연장된 시간 동안 지속될 수 있다. 추가로, CAR 매개 면역 반응은 CAR-변형된 T 세포가 CAR의 항원 결합 모이어티에 특이적인 면역 반응을 유도하는 입양 면역요법 접근법의 일부일 수 있다. 예를 들어, 항-CD19CD20 CAR-T 세포는 CD19 및 CD20을 발현하는 세포에 대해 특이적으로 면역 반응을 유도한다.

[0264] 본원에 개시된 데이터는 구체적으로 CD19CD20 scFv, 힌지 및 막횡단 도메인, 및 4-1BB 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 개시하지만, 본 발명은 본원의 다른 곳에 기술된 바와 같이 구축물의 각각의 성분에 대해 임의의 수의 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0265] 치료될 수 있는 암은 혈관화되지 않은, 또는 대부분 혈관화되지 않은 종양 및 혈관화된 종양을 포함한다. 암은 비-고형 종양 (예컨대, 혈액학적 종양, 예를 들어, 백혈병 및 림프종) 또는 고형 종양을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR로 치료하고자 하는 암의 유형으로는 암종, 모세포종 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 및 악성종양, 예컨대, 육종, 암종 및 흑색종을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암 또한 포함된다.

[0266] 혈액학적 암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액학적 (또는 혈행성 암)의 예는 급성 백혈병 (예컨대, 급성 림프구 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수형성 백혈병 및 골수모세포, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성 및 적백혈병), 만성 백혈병 (예컨대, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 골수형성 백혈병, 및 만성 림프구 백혈병), 진성 적혈구 증가증, 림프종, 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종 (무통성 및 고등급 형태), 다발성 골수종, 발렌스트롬 거대글로불린혈증, 장쇄 질환, 골수이형성 증후군, 모발 세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함한 백혈병을 포함한다.

[0267] 고형 종양은 대개 낭종 또는 액상 부위를 함유하지 않는 비정상적인 조직 종괴이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 상이한 유형의 고형 종양은 그를 형성하는 세포 유형에 따라 명명된다 (예컨대, 육종, 암종 및 림프종). 예컨대, 육종 및 암종과 같은 고형 종양의 예로는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 중피종, 악성 림프

종, 췌장암 및 난소암을 포함한다.

[0268] 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 또한 포유동물에서 생체외 면역화 및/또는 생체내 요법을 위한 한 유형의 백신으로 작용할 수 있다. 바람직하게, 포유동물은 인간이다.

[0269] 생체외 면역화와 관련하여, 하기 중 적어도 하나는 세포를 포유동물에게 투여하기 전에 시험관내에서 발생한다: i) 세포 확장, ii) CAR을 코딩하는 핵산을 세포에 도입, 및/또는 iii) 세포의 동결보존.

[0270] 생체외 절차는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 하기에서 추가로 자세히 논의된다. 간략하면, 세포는 포유동물 (바람직하게, 인간)로부터 단리되고, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터로 유전자조작으로 변형 (즉, 시험관내에서 형질도입 또는 형질감염)된다. CAR-변형된 세포는 포유동물 수용자에게 투여되어 치료 이점을 제공할 수 있다. 포유동물 수용자는 인간일 수 있고, CAR-변형된 세포는 수용자에 대해 자가일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수용자에 대해 동종이계, 동계 또는 이종일 수 있다.

[0271] 생체외 면역화의 관점에서 세포-기반 백신을 사용하는 것 외에, 본 발명은 환자에서 항원에 대해 지시되는 면역 반응을 유도하기 위한 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0272] 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 CAR-변형된 T 세포를 종양 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0273] 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 단독으로, 또는 희석제 및/또는 IL-2, IL-17 또는 다른 시토카인 또는 세포 집단과 같은 다른 성분과 함께 조합된 제약 조성물로서 투여될 수 있다. 간략하면, 본 발명의 제약 조성물은 하나 이상의 제약적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 조합하여 본원에 기술된 바와 같은 표적 세포 집단을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 예컨대, 중성 완충처리된 염수, 포스페이트 완충 처리된 염수 등과 같은 완충제; 예컨대, 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만낫톨과 같은 탄수화물; 단백질; 예컨대, 글리신과 같은 폴리펩티드 또는 아미노산; 항산화제; 예컨대, EDTA 또는 글루타티온과 같은 퀄레이트제; 애주번트 (예컨대, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제제화된다.

[0274] 본 발명의 제약 조성물은 치료 (또는 예방)하고자 하는 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 비록 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있지만, 투여량 및 투여 빈도는 환자의 상태, 환자의 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 따라 결정될 것이다.

[0275] "면역학적 유효량," "항-종양 유효량," "종양-억제 유효량" 또는 "치료량"이 명시되는 경우, 투여되는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이 정도, 환자 (대상체)의 상태의 개체 차이를 고려하여 의사에 의해 결정할 수 있다. 본원에 기술된 T 세포를 포함하는 제약 조성물은 일반적으로 10^4 내지 10^9 개의 세포/kg (체중), 바람직하게, 10^5 내지 10^6 개의 세포/kg (체중)의 투여량 (상기 범위 내의 모든 정수 값 포함)으로 투여될 수 있다고 언급될 수 있다. T 세포 조성물은 또한 상기 투여량으로 다회 투여될 수 있다. 세포는 면역요법에서 일반적으로 공지된 주입 기술을 이용하여 투여될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988] 참조). 특정 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 질환의 징후에 대해 환자를 모니터링하고, 그에 따라 치료를 조정함으로써 의학 기술분야의 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0276] 본 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식 (implantation) 또는 이식 (transplantation)을 비롯한 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 환자에게 피하, 진피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내 (*i.v.*) 주사에 의해 또는 복강내로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 진피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 바람직하게는 *i.v.* 주사에 의해 투여된다. T 세포의 조성물은 종양, 럼프절 또는 감염 부위에 직접적으로 주사될 수 있다.

[0277] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 방법, 또는 T 세포가 치료 수준으로 확장되는 관련 기술분야에 공지된 다른 방법을 이용하여 활성화 및 확장된 세포는 예컨대, 항바이러스 요법, 시도포비르 및 인터루킨-2, 시타라빈 (ARA-C로도 공지) 또는 MS 환자를 위한 나탈리주맙 치료 또는 건선 환자를 위한 에팔리주맙 치료 또는 PML 환자를 위한 다른 치료와 같은 작용제를 사용한 치료를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 수의 관련 치료 방식과 함께 (예컨대, 그 이전, 그와 동시에 또는 그 이후에) 환자에게 투여된다. 추가의 실시양태에서, 본 발명의 T 세포는 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대, 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코

페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역치료제와 함께 조합하여 사용될 수 있다. 추가의 실시양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, 또는 예컨대, 플루다라빈, 외부-빔 방사선 요법 (XRT), 사이클로포스파미드의 사용과 함께 (예컨대, 그 이전에, 그와 동시에 또는 그 이후에) 환자에게 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 대상체는 고용량 화학요법에 이어 말초 혈액 줄기 세포 이식으로 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 실시양태에서, 이식 후, 대상체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가의 실시양태에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.

[0278] 환자에게 투여하고자 하는 상기 치료의 투여량은 치료되는 병태의 정확한 성질 및 치료의 수용자에 따라 달라질 것이다. 환자 투여를 위한 투여량의 스케일링은 관련 기술분야에서 인정되는 실시에 따라 수행될 수 있다. 일반적으로, 1×10^6 내지 1×10^{10} 개의 본 발명의 변형된 T 세포 (예컨대, CAR-T-19/20 세포)는 예를 들어, 각각의 치료 또는 각각의 치료 과정에서 정맥내 주입에 의해 환자에게 적용될 수 있다.

[0279] 본 발명의 이점은 하기와 같다:

[0280] (1) 본 발명의 키메라 항원 수용체에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 특이적인 항-CD20 scFv 및 항-CD19 scFv이고; 특이적인 항-CD20 scFv 및 항-CD19 scFv를 특정 힌지 영역 및 세포내 도메인에 결합시켜 형성된 CAR은 낮은 세포독성 및 낮은 부작용으로 종양 세포를 사멸시키는 큰 능력을 나타낸다.

[0281] (2) 본 발명에 의해 제공되는 키메라 항원 수용체는 T 세포가 CAR 유전자를 운반하는 렌티바이러스에 의해 감염된 후에 CAR 단백질의 안정된 발현 및 막 국제화를 달성할 수 있다.

[0282] (3) 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 생체내에서 더욱 긴 장기간의 생존 기간 및 강력한 항-종양 효능을 갖고; IgG4 힌지-CH2-CH3 링커 영역으로 최적화된 CAR은 Fc 수용체의 결합, 및 후속되는 ADCC 효과 (항체-의존성 세포독성)를 피할 수 있다.

[0283] (4) 2개의 독립적인 CAR과 비교하여, 본 발명의 이중특이적 키메라 항원 수용체는 항-CD20 scFv 및 항-CD19 scFv, 둘 모두 포함하고, DNA 뜰프린트는 유의하게 감소되고 (DNA 길이는 40%만큼 감소), 구조의 크기가 작아 바이러스 벡터의 패키징 및 형질도입 효율에 유리하며, 이로써, 임상 효능을 직접적으로 개선시킨다. 추가로, 본 발명의 이중특이적 CAR은 비용이 더 낮고, 치유율은 더 높고, 안전성은 더 높다.

[0284] (5) 본 발명의 TN-LEU-19 또는 TH-OF-19 키메라 항원 수용체로 변형된 T-세포는 시험관내 사멸 및 생체내 CD19 및 CD20 양성 항원을 보유하는 악성 종양을 제거하는 매우 강력한 능력을 갖고, 오파투무맙은 더 강력하다. 이는 CD19 및 CD20 양성 백혈병 및 림프종의 치료에서 CAR-T의 임상 적용을 위한 새롭고 효과적인 방법 및 제제를 제공한다.

[0285] (6) 본 발명의 CAR-T 세포는 대부분의 악성 B 세포 종양에 대해 사멸 효과가 있고, 치료 범위가 더 넓으며, 커버리지 비율은 더 크고, 종양 세포가 회피하는 것을 더욱 효과적으로 막을 수 있다.

[0286] 본 발명은 특정 실시예를 참조하여 하기에서 추가로 예시될 것이다. 이를 실시예는 단지 예시를 위한 것이며, 본 발명의 범주를 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다. 특정 조건이 하기 실시예에 기술되지 않은 경우, 실험 방법은 일반적으로 종래 조건하에 또는 제조사의 설명서에 따라 수행된다. 백분율 및 부(part)는 달리 언급되지 않는 한, 중량 기준이다.

실시예 1 렌티바이러스 발현 벡터 구축

[0288] 전장 DNA를 합성 및 클로닝하여 코딩 플라스미드를 구축하였다. pWPT 렌티바이러스 벡터를 클로닝 벡터로 선택하였으며, 클로닝 부위는 BamH I 및 Sal I 부위였다. 여기서 본 발명에서 디자인된 두 CAR의 구조는 도 1에 제시되어 있다. TN-LEU-19의 아미노산 서열은 서열식별번호 15에 제시되어 있고, TN-OF-19의 아미노산 서열은 서열식별번호 16에 제시되어 있다 (여기서, 구조는 L-(OF)VL-(OF)VH-I-(FMC63)VH-(FMC63)VL-H-TM-C-CD3 ζ).

실시예 2 이중특이적 CAR의 시험관내 활성화 능력 검출

[0290] PBMC를 밀도 구배 원심분리에 의해 건강한 공여자의 정맥혈로부터 단리시켰다. 0일째, CD3 모노클로날 항체 (OKT3) 및 레트로넥틴(Retronectin) (다카라(TAKARA))으로 미리 코팅된 세포 배양 플라스크에서 PBMC를 활성화 시켰다. 배지는 1% 인간 알부민 및 300 U/mL 재조합 인간 인터루킨 2 (IL-2)를 함유하는 GT-551 세포 배양 배지였다. 3일째, 활성화된 PBMC를 정제된 TN-LEU-19 또는 TN-OF-19 렌티바이러스 용액으로 형질도입하였다. 6일째를 시작으로 TN-OF-19 및 TN-LEU-19 CAR-T 세포를 상응하는 활성 검정을 위해 채취할 수 있다. 단백질 L 방법을 이용하여, 7일 동안 배양된 CAR-T 세포에서 T 세포막 표면의 CAR 유전자 코딩 단백질의 발현 수준을 측

정하였다.

[0291] 7일 동안 배양된 CD19/20 이중특이성 CAR-T 세포를 사용하여 T 세포 활성화 마커 CD137 및 IFN γ 방출을 검출하였다. 1×10^5 개의 CAR-T 세포를 각각 1:1의 비로 CD19, CD20-양성 K562-CD19+, K562-CD20+, K562-CD19+CD20+ 및 Raji (CD19 및 CD20 자연적으로 발현) 종양 세포주 뿐만 아니라, CD19CD20-음성 K562 종양 세포주와 함께, 또는 종양 세포 부재하에서 18 h 동안 200 μ l GT-551 배지 중에서 공동 배양하였다. 이어서, T 세포 표면 상의 CD137의 발현 수준과 배양 상청액 중의 IFN γ 의 분비 수준을 각각 검출하였다.

[0292] 결과는 도 2a 및 2b에 제시되어 있다. 2개의 CART 세포 표면 상에서 CD137의 발현이 검출되었고, 배양 상청액에서 IFN γ 의 발현이 검출되었다. 여기서 TN-OF-19 세포는 TN-LEU-19보다 더 높은 CD137 활성화 수준 및 IFN γ 방출 수준을 갖는다.

실시예 3 항-CD19/CD20 이중특이적 CAR에 대한 최적의 항원 결합 도메인 확인

[0294] 본 발명자들은 항-CD20 scFv 및 항-CD19 scFv는 동일하지만, 순서는 상이한 이중특이적 CAR 2개를 제조하였다: TN-OF-19 (C-CAR039)는 항-CD20 scFv ("OF"), 이어서, 항-CD19 scFv ("FMC63")를 갖는 반면, TN-19-OF는 항-CD19 scFv ("FMC63"), 이어서, 항-CD20 scFv ("OF")를 갖는다 (도 16a).

[0295] 도 16b에 제시된 바와 같이, TN-OF-19 (C-CAR039)는 CD19 및 CD20-양성 세포에 대하여 CAR-T20-29 (V_L - V_H)보다 더 높은 시험관내 활성 (예컨대, 인터페론- γ 또는 IFN- γ 방출 유도)을 입증하였다.

[0296] 추가로, 본 발명자들은 항-CD20 scFv 및 항-CD19 scFv 순서는 동일하지만 (즉, 항-CD20 scFv ("OF"), 이어서, 항-CD19 scFv ("FMC63")), 항-CD20 scFv (OF) 또는 항-CD19 scFv (FMC63)에서 V_H 및 V_L 순서는 상이한, 다른 이중특이적 CAR을 제조하였다 (도 16c).

[0297] 도 16d에 제시된 바와 같이, TN-OF-19 (C-CAR039)는 V_H 및 V_L 순서가 상이한 다른 이중특이적 CAR과 비교하여 우수한 항-종양 활성을 입증하였다.

[0298] 본 발명자들의 시험관내 데이터는 이중특이적 CAR 중 항-CD20 scFv 및 항-CD19 scFv의 순서 뿐만 아니라, scFv 중 V_H 및 V_L 의 순서가 이중특이적 CAR의 특성에 영향을 줄 수 있다는 것을 나타낸다.

실시예 4 시험관내에서의 CD19/20 이중특이적 CAR-T 세포의 세포독성 검출

[0300] 실시예 2에서 제조된 CAR-T 세포를 LDH 방출 검정법에 의해 세포독성에 대해 시험하였다. 표적 세포는 K562, K562-CD19+, K562-CD20+, K562-CD19+CD20+ 및 Raji 세포이고; 이펙터 세포는 NT, TN-LEU-19 및 TN-OF-19 세포이다. 이펙터-표적 비를 설정하였고, 여기서 이펙터 세포의 개수: 표적 세포의 개수 = 5:1, 10:1, 20:1 및 40:1이었다. 결과는 도 3a에 제시되어 있다. TN-LEU-19 및 TN-OF-19 CAR-T 세포는 모두 CD19/20 양성 종양 세포에서 아폽토시스를 잘 유도하고, LDH를 잘 방출할 수 있다.

[0301] CAR-T19/20 세포에 의해 유도된 종양 세포 사멸 동안 CD107a (T-세포 탈과립화 마커) 방출 수준을 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 세포수 1×10^5 개의 이펙터 세포 CAR-T19/20 (TN-OF-19 및 TN-LEU-19)을 각각 2×10^5 개의 표적 종양 세포와 함께 공동 배양하였다. 표적 세포는 각각 K562-CD19+, K562-CD20+, K562-CD19+CD20+ 및 K562 세포, Raji 세포, Romas 세포(CD19+CD20+)이다. 결과는 도 3b에 제시되어 있다. 두 CART 세포 모두 종양 세포 사멸 동안 CD107a의 방출을 잘 유도할 수 있다. 여기서 TN-OF-19 세포는 세포독성 마커로서 CD107a를 TN-LEU-19 세포보다 약간 더 높게 방출한다.

실시예 5 마우스에서 이식된 종양 세포에 대한 CAR-T19/20의 억제 효과

[0303] 동물에 주사된 종양 세포는 루시페라제 리포터 유전자를 보유하는 Raji 세포 (루시페라제를 발현하는 Raji)였다. 본 실험에서, 종양 세포인 Raji를 마우스에 주사하고, 1주일 동안 성장시킨 후, 이어서, 이펙터 T 세포를 주사하였다. 이펙터 T 세포를 NT, TN-LEU-19 및 TN-OF-19인 3개 군으로 나누었다. 확장된 이펙터 T 세포를 꼬리 정맥을 통해 NSG 마우스에 주사한 후, 마우스의 형광 강도 (IVIS 형광 이미징을 통해) 및 마우스의 체중을 매 7일마다 기록하였다. 21일째 실험을 중단하고, 통계 결과를 분석하였다.

[0304] 결과는 도 4a-4c에 제시되어 있다. 도 4a는 3개 군의 마우스에 이펙터 T 세포를 주사한 후 마우스의 체중 변화를 보여주는 것이다. 두 유형의 CART 세포, CART-TN-OF-19 및 CART-TN-LEU-19와 비교하여, NT의 마우스는 체중이 유의하게 감소하였고, 두 CART 세포 군 중의 마우스는 체중이 약간 더 많이 증가하였다. 생체내 연구를

위해, 리포터로서 반딧불이 루시페라제를 발현하는 인간 버킷 램프종 Raji 세포인 Raji-Luc 세포를 NSG 마우스에 이종이식시켰다. 이어서, 상이한 CAR-T 세포 또는 음성 대조군을 마우스에 투여하였다. Raji-Luc를 이종이식받은 동물의 형광 강도를 처리 후 검정하였으며, 이는 동물에서 종양 세포의 증식을 반영하였다. 도 4b는 3개의 마우스 군의 평균 형광 강도를 보여주는 것이다. 결과는 NT 군의 마우스의 평균 형광 강도가 유의하게 증가한 반면, 두 CART 세포군의 마우스의 평균 형광 강도는 감소한 것으로 나타났고, 이는 TN-OF-19 및 TN-LEU-19 CART 세포 둘 모두가 NT와 비교하여 종양 성장을 억제할 수 있다는 것을 시사하는 것이다. 여기서 TN-OF-19 세포는 14일째 후에는 TN-LEU-19 세포보다 종양 성장을 더욱 잘 억제하였고, TN-LEU-19 군의 종양 성장 곡선은 유의하게 재발하였다. 도 4c는 두 CART 세포군 및 NT 군의 형광 강도 IVIS 이미징을 보여주는 것이다. TN-OF-19 CAR-T 세포는 생체내에서 TN-LEU-19 세포보다 종양 세포를 더욱 잘 억제하거나, 사멸시킬 수 있다.

[0305] 따라서, CD20/CD19 이중-CAR을 (나라브 NS(Nirav NS) 통 C(Tong C)에 의한 임상 연구에서 사용된) Leu16 scFv 와 비교하였을 때, C-CAR039는 시험관내 및 생체내에서 단일 양성 및 이중 양성 종양 표적 둘 모두에 대하여 우수한 항-종양 활성을 보였다.

[0306] 실시예 6 생체내 TN-OF-19 CAR-T 세포 및 CD19 특이적 CAR-T 세포의 억제 효과 비교

[0307] 반딧불이 루시페라제를 발현하는 Raji 세포 1×10^6 개를 꼬리 정맥 주사를 통해 6 내지 8주령된 NPG 마우스 (NOD-Cg.PrkdcSCID IL-2Rgcnull/vst)에 투여하였다. 7일 후, D-루시페린을 i.p. 주사하고, 10-15분 후 브루커 인비보 X트림(Bruker In Vivo Xtreme) (브루커, X트림 BI(Xtreme BI)) 상에서 180초 동안 이미징하여 종양 생착을 측정하였다. 종양 부담에 기초하여 마우스를 연구군 ($n=6$ /군)으로 동등하게 분배하였다. TN-OF-19(L), TN-OF-19(M), TN-OF-19(H) 군을 꼬리 정맥 주사를 통해 1×10^6 개, 2.5×10^6 개, 및 5×10^6 개의 CAR+ T 세포로 각기 처리하였다. 1×10^6 개의 비형질도입된 T 세포 (N.T.) 및 동일한 공여자로부터의 단일 표적 CD19 특이적 CAR-T 세포가 대조군으로 사용되었다. 종양 성장은 주사 후 7일, 10일, 21일째에 마우스 전신 평균 라디언스에 기초하여 평가하였다. 도 5a는 이중특이적 TN-OF-19 CAR-T 세포가 생체내에서 CD19 특이적 CAR-T 세포보다 종양 세포를 더욱 잘 억제시키거나, 또는 사멸시킬 수 있다는 것을 보여주는 것이다. 특히, 치료 초기에 이중특이적 TN-OF-19 CAR-T는 유의하게 더 빠른 억제 효과를 나타낸다. 도 5b는 4개의 CAR-T 세포군 및 NT 군에서의 형광 강도 IVIS 이미징을 보여주는 것이다.

[0308] 실시예 7 CD20/CD19 이중특이적 CAR의 항원 특이성

[0309] TN-OF-19 CAR 중 이중특이적 scFv의 친화성 및 특이성을 조사하기 위해, 토끼 IgG1 Fc 영역과 프레임 내에서 CD20 scFv (예컨대, 오파투무맙 mAb으로부터 유래) 및 CD19 scFv (예컨대, FMC63 mAb로부터 유래)를 연결하여 키메라 토끼 모노클로날 항체를 생성하였다. CD19 및 CD20 scFv를 G4S 링커에 의해 교대로 연결하였다. 문자 순서는 OF VL-VH-G4S-FMC63 VH-VL이며, 이는 TN-OF-19 중 scFV와 동일한 순서이다. 키메라 항체는 일시적 형질감염 후 293T 세포에서 발현되었다. 염색의 특이성에 대한 이 키메라 항체의 검증은 유세포 분석법에 의해 수행하였다. 간략하면, 3개의 안정한 세포주 (A549-CD19, A549-CD20, A549-CD19-CD20)를 표적으로 사용하였고, CD19-CD20-A549 세포 및 CD19+CD20+ Raji 세포를 대조군으로 사용하였다. 모든 세포를 세척하고, 재현탁하여 30분 동안 2% 혈청으로 차단하였다. 5×10^5 개의 세포를 FACS 바이알로 옮기고, 세척하고, 4°C에서 1h 동안 재조합 항체 (최종 농도 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$)로 염색하였다. 세척 후, 2차 항체 (염소 항-토끼 IgG)를 4°C 암실에서 30분간 첨가하였다. 마지막으로, 세포를 세척하고, FACS 분석을 위해 $200 \mu\text{l}$ FACS 완충제에 재현탁시켰다. 도 6b는 키메라 항체가 CD19 또는 CD20, 또는 둘 모두가 있는 세포에 결합하였지만, 두 항원이 모두 결여된 세포에는 결합하지 않았다는 것을 보여주는 것으로, 이는 이중특이적 결합 도메인은 결합을 위해서는 오직 단 하나의 동족 항원만을 요구하였고, 어떤 새로운 특이적 인식 부위도 형성되지 않았다는 것을 시사하는 것이다.

[0310] 조직 교차 반응성 및 전체 게놈 막 프로테옴 어레이 연구를 통해 C-CAR039의 결합 특이성을 확인하였다.

[0311] 도 17a는 C-CAR039의 항원 결합 도메인의 결합 특이성을 평가하는 프로세스를 보여주는 것이다. 표 1은 혈액, 골수, 램프절, 비장, 흉선의 인간 램프구에서 강한 특이적 막 염색이 관찰되었다는 것을 보여주는 것이다 (IHC GLP 연구)

[0312] CD19, CD20 및 FCGR1A는 $5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 중간 정도로 결합하는 것으로 확인되었으며, 어떤 다른 유의한 상호작용도 확인되지 않았다. FCGR1은 rabFc에 결합하는 것으로 보고되었다 (도 17b).

[0313]

표 1

조직	2.0 µg/mL			10.0 µg/mL		
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 1	공여자 2	공여자 3
방광 중 산재된 림프구의 세포막	2-1 ^a	3-3	2-1	2-1	3-3	2-1
혈액 세포 중 림프구의 세포막	2-1	2-1	2-1	2-1	2-1	2-1
골수 중 림프구의 세포막	1-2	1-2	1-2	2-3	2-3	2-3
림프절 중 림프구의 세포막	2-2	2-2	3-2	3-3	3-3	3-3
비장 림프구의 세포막	2-2	2-2	2-2	3-2	3-2	3-2
흉선 림프구의 세포막	1-1	2-3	0-0	2-2	3-3	1-1

[0314]

a. 양성 강도 - 특정 염색의 백분율. 0, 염색된 세포 없음; 1, 최소 또는 모호한 염색; 2, 약한 양성 염색; 3, 중간 정도의 양성 염색. 0, 염색된 세포 없음; 1, <25% 세포가 염색; 2, 25-50% 세포가 염색. 3, 50%-75% 세포가 염색.

[0315]

실시예 8: (CD20/19 이중특이적 CAR 제조를 위한) CD20 특이적 CAR의 스크리닝 및 기능 검증

[0316]

CD20/CD19 이중특이적 CAR 구축 전, 본 발명자들은 CD 20 특이적 scFV 후보물질을 스크리닝하고, 범위를 좁히는 광범위한 연구를 수행하였다. 도 7은 6개의 상이한 scFV 및 상이한 헌지/TM/신호전달 도메인을 갖는 16개의 CD20 특이적 CAR의 구조를 보여주는 것이다. 전장 DNA를 합성하고, 클로닝하여 코딩 플라스미드를 구축하였고, 본 발명자들은 다양한 CD20 발현 표적 세포를 사용하여 상기 CAR의 항-종양 활성을 시험하였다.

[0317]

도 8a는 CAR-T20.1, CAR-T20.5, CAR-T20.6, CAR-T20.7, CAR-T20.8, CAR-T20.9 및 CAR-T20.10을 스크리닝하는 IFN γ 방출 검정법의 결과를 보여주는 것이다. 상기 CAR-T 중 오직 CAR-T20.9 (Leu16) 및 CAR-T20.10 (Leu16) 만이 더 높은 양성 IFN γ 방출을 보였다.

[0318]

도 8b는 CAR-T20.1, CAR-T20.9, CAR-T20.10, CAR-T20.11, CAR-T20.12, CAR-T20.13, CAR-T20.14, CAR-T20.15 및 CAR-T20.16을 스크리닝하는 IFN γ 방출 검정법의 결과를 보여주는 것이다. 상기 CAR-T 중 CAR-T20.10 (Leu16) 및 CAR-T20.14 (OF)는 더 높은 양성 IFN γ 방출을 보였다.

[0319]

도 8c는 CAR-T20.9, CAR-T20.12, CAR-T20.14, CAR-T20.17, CAR-T20.18, 및 CAR-T20.19를 스크리닝하는 IFN γ 방출 검정법의 결과를 보여주는 것이다. 상기 CAR-T 중 CAR-T20.14 (OF) 및 CAR-T20.19 (OF)는 더 높은 양성 IFN γ 방출을 보였다.

[0320]

도 9a는 LDH 방출 검정법에 의해 세포독성에 대하여 시험된 CAR-T20.17 (Leu16 제3 세대), CAR-T20.18 (Leu16 제2 세대), CAR-T20.19 (OF 제2 세대) 세포의 결과를 보여주는 것이다. 표적 세포는 CD20 양성 세포인 Raji 및 Ramos, 및 CD20 음성 Molt4이다. 상기의 모든 3가지 CD20 CAR-T 세포는 CD20-양성 종양 세포에서 아폽토시스를 유도하고, LDH를 방출할 수 있으며, 이는 CAR-T20.17, CAR-T20.18, 및 CAR-T20.19가 표적 세포인 CD20-양성 Raji 및 Ramos 세포에 대해 강력한 사멸 효과를 보였다는 것을 시사하는 것이다.

[0321]

도 9b는 NSG 마우스 연구에서 종양 성장의 생체내 억제를 보여주는 것이다. 동물에 주사된 종양 세포는 루시페라제를 발현하는 Raji이다. 본 실험에서, 종양 세포인 Raji를 마우스에 주사하고, 1주일 동안 성장시킨 후, 이어서, 이펙터 T 세포를 꼬리 정맥을 통해 주사한 후, 마우스의 형광 강도 (IVIS 형광 이미징을 통해) 및 마우스의 체중을 매 7일마다 기록하였다. 21일째 실험을 중단하고, 통계 결과를 분석하였다. 본 결과에서 CAR-T20.19 (OF) 세포는 14일째 후에는 CAR-T20.17 (Leu16) 및 CAR-T20.18 (Leu16) 세포보다 종양 성장을 더욱 잘 억제시키는 것으로 나타났다.

[0322]

요약하면, 다수의 실험 및 비교를 통해, 20.1, 20.2, 20.4, 20.5, 20.6, 20.7, 20.8 및 20.15는 기본적으로 무효이고, 20.11, 20.12, 20.13은 어느 정도 효과가 있었지만, 그 효과는 20.9, 20.10, 20.14, 20.16, 20.17, 20.18 및 20.19의 효과보다는 작았고, 여기서 20.19(OF)의 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다. 상기 구조에 기초하여, CD20 scFv (OF) 및 CD19 scFv (FMC63)를 새 이중특이적 키메라 항원 수용체 TN-OF-19에서 탠덤으로 사용하였고, 이는 추가 분석을 위해 가장 우수한 후보물질인 것으로 간주되었다.

[0324] 실시예 7에 관여하는 CD20 특이적 CAR의 아미노산 서열은 표 2에 제시되어 있다.

표 2 키메라 항원 수용체 및 그의 서열

CAR-T	서열	SEQ ID NO:
CAR-T 20.1	MDIQLTQSPAIALSASPGEKVTMTCRASSLSFMHWYQQKPGSSPKPWIY ATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFG AGTKLEISSGGGSGGGSGDVMGVDSGGLVQPGGSRKLSCAAPGFT FSSFGMHWVVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRFTISRDNPKN TLFLQMKLPSLCYGLLGP RDHVHRLLKTRLNSIMYFSHFVPVFLPAKP TTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELEFRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	23
CAR-T 20.5	MALPV TALLPL ALLHAARPDIQLTQSPAIALSASPGEKVTMTCRASSSL SFMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVE AEDAASYFCHQWSSNPLTFGAGTKLEIGGGGSGGGSGGGSDVMGV DSGGGLVQPGGSRKLSCAAPGFTSSFGMHWVVRQAPEKGLEWVAYISS PSSTLHYADRVKGRFTISRDNPNTLFLQMKLPSLCYGLLGP RDHVHRL LTTRTTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNDLQGSCRS	24
CAR-T 20.6	MALPV TALLPL ALLHAARPDV MVGVDGGGLVQPGGSRKLSCAAPGF TFSSFGMHWVVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRFTISRDNP NTLFLQMKLPSLCYGLLGP RDHVHRLGGGGSGGGSGGGSDIQLTQ SPAIALSASPGEKVTMTCRASSLSFMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLAS GVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGAGTKLEI TRTTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNDLQGSCRS	25

[0326]

CAR-T 20.7	MALPV TALLPL ALLLHAARPQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV SYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKGGGSGGGSGGGGSQVQLQ QPGAELVKPGAVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIY PGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLSEDSAVYYCARST YYGGDWYFNWVGAGTTVTSATRTTPAPRPPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGA VHTRGDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCRSKRGR KKLLYIFKQPFRPQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNDL QGSCRS	26
CAR-T 20.8	MALPV TALLPL ALLLHAARPQVQLQQPGAEVKGASVMSCKASG YTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTAD KSSSTAYMQLSSLSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTS AGGGGSGGGGGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVYIH WFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKTRTTTPAPRPPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGA VHTRGDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCRSKRGR RKKLLYIFKQPFRPQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTND LQGSCRS	27
CAR-T 20.9	MALPV TALLPL ALLLHAARPEVQLQQSGAEVKGASVMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTS GGGGSGGGGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTLEIKESKYGPPCPAPAEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGFWLVVVGGVLACYSLTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY MNMTPRRPGPTRKHQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFRP QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYS EIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	28
CAR-T 20.10	MALPV TALLPL ALLLHAARPEVQLQQSGAEVKGASVMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADK	29

[0327]

	SSSTAYMQLSSLTSESDADYYCARSNYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGGGGSDIVLTQSPAILTASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPFTGGGTKEIKESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPR EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKFWVLVVGGVLACYSLTVAFIIFWVRSKRSRLLHSFY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKGRKKLLYIFKQPFMRPV QTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CAR-T 20.11	MALPTALLPLALLHAARPDIVLTQSPAILTASPGEKVTMTCRASSSV NYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVE AEDAATYYCQQWSFNPPFTGGGTKEIKGGGGGGGGGGSEVQL QQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAI YPNGDTSYNQFKKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTSESDADYYCARS NYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSESKEYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPR EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKJYIWAPLAGTCGVLLSLVITYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	30
CAR-T 20.12	MALPTALLPLALLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQFKKGATLTADK SSSTAYMQLSSLTSESDADYYCARSNYGSSYWFFDVWGAGTTVTSS GGGGSGGGGGGGSDIVLTQSPAILTASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPFTGGGTKEIKESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPR EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG	31

[0328]

	QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNE LNLRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CAR-T 20.13	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGY AFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLWVWQGTLTVSSGG GGGGGGGGGGSDIVMTQTPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKRVEAE DVGYYYCAQNLELPYTFCGGTKVEIKRTVESKYGPPCPCCPAPEFLGGP SVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNENLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR	32
CAR-T 20.14	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT FNDYAMHWVRQAPGKGLEWWSTISWNSGSIGYADSVKGRTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVVS SGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFA VYYCQQRSNWPIFGQGTRLEIKESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNE LNLRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	33

[0329]

CAR-T 20.15	MALPV TALLPL ALLLHA ARPGD VMGV DSGGLV QPGGS RKLSCA AP GFTSSFGMHW VRQ APEK GLEW VAYI SSPS STLHY ADRV KGR FTIS RDN PKNTLFLQM KLP SL CYGLL GPRDH VHL KGGG SGGG SGGG SDI Q LTQSP AILS ASPGEK VT MTCRASS LSF MHWY QQKG PSSPK PWI YAT SN LASGP PARF SGSGT SYSL TIST VEAE DA ASYFC H QWSSNPL TFGAGT KLEIES KYGPPC PCPAPE FLLGGPSVFLFP KPKDTLMIS RTPEV CTVV D VSQEDPEVQFNWYV DGVEVHN A KTPREEQFNSTYRVV SVLTV LH QD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFCSVMHEALHNHTQKSLSLSGKIYIWAPLAGTC GVLLSLVITLYC KRG RKKLLYIFKQPFMRVQTTQEE DGCSCRPEEEE GGCELRVFKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE NLGRREYDVL DKRR GRD PEMG GKPRRKNPQEGLYNE LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKD TYDALHM QALPPR	34
CAR-T 20.16	MALPV TALLPL ALLLHA ARPVQV LQQPG AELVK PGASV KM SCK ASG YTFTSYNMHWVKQT PG RGLE WIGAIY PG NGDT SYNQKF KGKA TLAD KSSSTAYMQLSSLTSED SAVYY CARST YYGGDWYF NVWGAGT TVVS AGGGGSGGGGGGGGSQIVL SQPAILSASPGEK VT MTCRASS VS YIH WFQQKPGSSPKWIYATSNL ASGP VPVR FSGSGSGT SYSL TIRVEAEDA ATYYCQQWTSNPPTFGGT KLEIKES KYGPPC PCPAPE FLLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEV CTVV DV SQEDPEVQFNWYV DGVEVHN A KTPR EEQFNSTYRVV SVLTV LH QD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSVMHEALHNHTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC KRG RKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEE DGCSCRPEEEE GGCELRVFKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLRREYDVL DKRR GRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNE LQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKD TYDALHM QALPPR	35
CAR-T 20.17	MALPV TALLPL ALLLHA ARPEVQ LQQSG AELVK PGASV KM SCK ASGY TFTSYNMHWVKQT PG QGLE WIGAIY PG NGDT SYNQKF KGKA TLADK SSSTAYMQLSSLTSED SADYY CARS NYYGSSYWFFDV WGAGT TVVS GGGGSGGGGGGGSDIVL TQSP AILSASPGEK VT MTCRASS VNYMD WYQKKPGSSPKWIYATSNL ASGP PARF SGSGSGT SYSL TIRVEAEDA ATYYCQQWSFN PPTFGGT KLEIKES KYGPPC PCPAPE FEGG PSVFLFP PKPKDTLMISRTPEV CTVV DV SQEDPEVQFNWYV DGVEVHN A KTPR	36

	EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHTQ KSLSLSGFWVLVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CAR-T 20.18	MALPV TALLPL ALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFDFVGAGTTVSS GGGGSGGGGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVMTCRASSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPCCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHTQ KSLSLSGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY	37
CAR-T 20.19	MALPV TALLPL ALLLHAARPEVQLVESGGLVQPGRSRLSCAASGFT FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYYGMDVWGQGTTVTS SGGGGSGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTISLEPEDFA VYYCQQRSNWPIFGQGTRLEIKESKYGPPCPCCPAPEFEGGPSVFLFP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHTQ KSLSLSGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE	38

[0331]

	LNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
[0332]		

[0333] 실시예 9 TN-OF-19 CAR-T 세포의 I상 임상 시험

C-CAR039 (즉, TN-OF-19 CAR-T 세포, NCT04317885)의 안전성 및 효능을 평가하기 위해, 재발성/불응성 비-호지킨 림프종 (R/R NHL) 환자를 대상으로 1상 시험을 수행하였다. 성분채집술에 의해 T 세포를 수확한 후, C-CAR039를 제조하고, 표준 3일 사이클로포스파미드/플루다라빈 캔디셔닝 요법 후에 단일 정맥내 용량으로 주입하였다. C-CAR039는 무혈청, 반자동, 디지털 폐쇄 시스템에서 제조되었으며, 정맥에서 정맥까지의 시간의 중간값은 18일이었다. 제조 성공률은 100%였다. 2020년 8월 3일 현재, 16명의 환자에게 1.0×10^6 내지 5.0×10^6 개의 CAR-T 세포/kg의 용량 범위로 C-CAR039를 주입하였다. 14명의 환자는 적어도 1개월의 평가 가능한 안전성 데이터를 갖고, 13명의 환자 (11명의 DLBCL, 2명의 FL 환자)는 1개월 이상의 유효성 데이터를 가졌다.

[0335] 주요 자격 기준은 하기 사항을 포함한다: (1) 18-75세; (2) DLBCL, FL, MCL을 포함하는 r/r B-NHL; (3) CD19 또는 CD20 양성 질환; (4) 이전에 항-CD19 요법에 대한 경험 없음; 및 (5) 활동성 CNS 병발 없음. 안전성 평가는 치료 후 발생하는 유해 사례 (CTCAE V5.0)의 발생률 및 중증도를 포함한다. 효능 평가는 루가노 분류 (Lugano Classification) 2014: ORR; DOR; PFS; OS를 포함한다.

[0336] 2021년 1월 31일 데이터 컷오프로 30명의 환자가 4개의 임상 센터에 등록하였고; 28명의 환자가 투약받았고; 정

맥에서 정맥까지의 시간의 중간값은 19일이었다. 25명의 환자는 1개월 데이터를 가지고 있고; 17명의 환자는 3개월 데이터를 가지고 있고; 12명의 환자는 6개월 데이터를 가지고 있다. 주입을 받은 환자 1명은 기준선에서 평가가능한 질환 활성을 보이지 않는다.

[0337] 본 발명자들의 이중특이적 CAR 치료 시작 전 환자의 기준선 인구 통계 및 임상 특성이 표 3에 제시되어 있다.

[0338] 투약받은 환자 연령 중간값은 54세 (범위: 28-71세)였다. 선행 요법 차수 중간값은 3 (범위: 1-5차의 선행 요법)이었다. 이전에 자가 줄기 세포 이식 (ASCT)을 받은 환자는 5명 (20%)이었다.

표 3 환자의 기준선 임상적 특징 요약

특징	N=25	특징	N=25
연령 중간값, yrs (범위)	54 (28-71)	선행 요법 차수 중간값, n (범위)	3 (1-5)
• 연령 ≥ 65, n (%)	8 (32.0)	• 1, n (%)	1 (4.0)
남성/여성, n	18/7	• 2, n (%)	9 (36.0)
NHL 하위유형, n (%)		• 3, n (%)	3 (12.0)
• DLBCL	12 (88.0)	• 4, n (%)	7 (28.0)
• PMBCL	1 (4.0)	• 5, n (%)	5 (20.0)
• FL	1 (4.0)	선행 ASCT, n (%)	5 (20.0)
• tFL	1 (4.0)	마지막 선행 요법에 대한 PD로서의 최적의 반응, n (%)	14 (56.0)
ECOG PS, n (%)		브릿징 요법을 받은 경우, n (%)	5 (20.0)
• 0	15 (60.0)	주입 투여량 중간값, ×10 ⁶ /kg (범위)	2.5 (1.0-5.0)
• 1	10 (40.0)		
IPI 점수 3/4, n (%)	6 (24.0)		
엔 아버(Ann Arbor) 단계	III / IV, n (%)		
III / IV, n (%)	19 (76.0)		

[0340] 표 3은 환자의 기준선 임상적 특징 요약이다.

[0341] 도 10은 CAR039 r/r NHL 연구 디자인 및 흐름도를 보여주는 것이다. 구체적으로, 치료 21일 전 (D-21)에 환자를 스크리닝하였다. 자격을 갖춘 대상체가 등록하였고, 말초 혈액 백혈구를 수집하였다. 수집된 말초 혈액 백혈구를 사용하여 CAR-T 세포를 제조하였다. CAR-T 주입 전 -5일째 (D-5), -4일째 (D-4) 및 -3일째 (D-3)에 환자는 플루다라빈 (30 mg/m²/d, 정맥내, 3일 동안 1일 1회) 및 사이클로포스파미드 (300 mg/m²/d, 정맥내, 3일 동안 1일 1회)를 포함하는 림프구제거 전처리를 받았다. 림프구제거 후 대략 72시간 경과시, 환자는 0일째 (D0) 단일 주입으로 1.0 × 10⁶, 2.5 × 10⁶ 또는 5.0 × 10⁶개의 CAR-T 세포/kg (체중)을 투여받았다. 환자에 대한 추적 조사는 주입 후 4일째 7일째, 10일째, 2주째, 3주째, 4주째, 8주째, 12주째, 6개월째, 9개월째, 및 12개월째에 수행하였다. 제1 임상 반응 평가는 CAR-T 주입 후 4주째에 이루어졌다.

[0342] 환자의 부작용 (치료 후 발생하는 유해 사례, TEAE)을 기록하였다 (표 4). 3 등급 이상의 시토카인 방출 증후군 (CRS)은 단 1명 (4%) 있었다. 신경독성은 2명의 환자 (8.0%)에서만 관찰되었으며, 3등급 이상의 신경독성은 없었다. 예컨대, 호흡구감소증 및 혈소판감소증과 같은 혈구감소증은 대부분 플루다라빈/사이클로포스파미드 (Cy/Flu) 림프구제거와 관련이 있었다. 혈구감소증도 가역적이었다. 이는 이중특이적 CAR이 우수한 안전성 프로파일을 가졌다는 것을 입증하였다.

[0343]

표 4 치료 후 발생하는 유해 사례 (AE) 요약

AE* ($\geq 25\%$) n (%)	모든 등급 (N=25)	등급 ≥ 3 (N=25)
호중구감소증	25 (100)	22 (88.0)
혈소판감소증	13 (52.0)	4 (16.0)
빈혈	24 (96.0)	8 (40.0)
감염	13 (52.0)	0 (0)

[0344]

* CTCAE V5.0.

[0345]

표 5 안전성 프로파일

CRS & 신경독성**	모든 등급 (N=25)	등급 ≥ 3 (N=25)
CRS, n (%)	24 (96.0)	1 (4)
• 발병까지의 일수(증간격), d	3 (0-10) (범위)	
• 해소까지의 일수(증간격), d	4 (1-25) (범위)	
• 토실리주맙으로 치료, n (%)	4 (16.0)	
• 스테로이드로 치료, n (%)	2 (8.0)	
신경독성, n (%)	2 (8.0)	0 (0)
• 발병까지의 일수, d	16 (4-28)	
• 해소까지의 일수, d	NA	
• 스테로이드로 치료, n (%)	1 (4.0)	
ICU 입원, n (%)	0	

[0346]

** 문헌 [ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells 2019].

[0349]

표 6 CRS & 신경독성

CRS & 신경독성	전체 (N=25)	1.0 MPK (N=4)	2.0/2.5 MPK (N=14)	4.0/5.0 MPK (N=7)
CRS, n (%)	24 (96.0)	4 (100)	13 (92.9)	7 (100)
• 등급 1/2/3/4/5, n	18/5/1/0/0	3/1/0/0/0	10/2/1/0/0	5/2/0/0/0
• 발병까지의 일수(중간값), d (범위)	3 (0-10)	7 (2-10)	4 (1-10)	1 (0-9)
• 해소까지의 일수(중간값), d (범위)	4 (1-25)	2.5 (1-7)	4 (1-25)	6 (1-15)
• 혈관수축제로 치료, %	1 (4.0)	0 (0)	1 (7.1)	0 (0)
• 토플리주맙으로 치료, %	4 (16.0)	0 (0)	2 (14.3)	2 (28.6)
• 스테로이드로 치료, %	2 (8.0)	0 (0)	2 (14.3)	0 (0)
신경독성*, n (%)	2 (8.0)	0 (0)	0 (0)	2 (28.6)
등급 1/2/3/4/5, n	2/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	2/0/0/0/0
발병까지의 일수(중간값), d (범위)	16 (4-28)	NA	NA	
해소까지의 일수(중간값)*, d (범위)	NA	NA	NA	NA
스테로이드로 치료, %	1 (4.0)	NA	NA	1 (4.0)
ICU 입원, n (%)	0	0	0	0

[0350]

* 환자 1명에서는 컷오프일까지 해소되지 않았다.

[0351]

C-CAR039 치료는 내약성이 우수하였고, 25명의 환자 중 1건의 3 등급 CRS, 및 2건의 1 등급 신경독성 이벤트가 발생하였다. 혈구감소증은 대부분 켄디셔닝 요법 (Cy/F1u 림프구체거)과 관련이 있었고, 이는 일반적이며, 가역적이었다.

[0352]

1개월째에서의 평가시, 13명의 환자 중 12명이 임상적 개선 (전체 반응률 또는 ORR=92%)을 보였고, DLBCL 환자 11명 중 11명이 치료에 반응하였다 (ORR=100%). 추적 조사 기간의 중간값은 70일 (범위: 35-257일)이었다. 최적의 전체 반응 (BOR)은 10건의 완전 응답 (CR) 및 2건의 부분 반응 (PR)을 포함한다.

[0353]

도 11은 C-CAR039 임상 결과의 요약을 보여주는 것이다. 세가지 (3개) 투여량으로 투여하였다: (1) 4.0×10^6 또는 $5.0 \times 10^6 / kg$ (N=7); (2) 2.0×10^6 또는 $2.5 \times 10^6 / kg$ (N=14); 및 (3) $1.0 \times 10^6 / kg$ (N=4).

[0354]

대략 14개월 후, ORR은 92% (환자 25명 중 23명)였고, CR은 84% (환자 25명 중 21명)였다. 6개월째 CR 비율은 82% (환자 11명 중 9명)였다. 추적 조사 기간 (F/U) 중간값은 5.3개월 (범위: 1.0 ~ 14.3개월)이었다.

[0355]

도 18은 C-CAR039에 대한 PFS의 카플란 마이어 추정을 보여주는 것이다. 6개월째 PFS는 87.31%이고, 95% 신뢰 구간(CI)은 71.2 내지 100.0이다. 반응 기간 (DOR) 중앙값에 도달하지 못했다.

[0356]

도 19는 C-CAR039의 PK/PD 프로파일을 보여주는 것이다. 상이한 용량군 간에 PK 프로파일의 통계적 차이는 없었다.

[0357]

도 20은 재발 환자의 말초 혈액 중의 PK/PD 프로파일 (CAR-T 확장 및 B 세포 고갈)을 보여주는 것이다.

[0358]

도 12는 C-CAR039 치료 이전 및 이후의 환자의 예를 보여주는 것이다. CAR T 치료 3개월 후 종양 병변의 크기가 유의하게 감소했다는 것을 명확하게 보여준다.

[0359]

실시예 10 C-CAR039의 PK 프로파일

[0360]

말초 혈액에서의 C-CAR039 증식 및 확장은 종양 퇴행과 양의 상관관계가 있다. C-CAR039 AUC(0-28일)와 C최대 사이의 초기의 양의 상관관계 추세 및 임상 반응이 관찰된다.

[0361]

도 13은 환자의 혈액에서의 C-CAR039의 증식 및 확장을 보여주는 것이다. 결과는 C-CAR008 세포가 주사 후 효과적으로 확장되었다는 것을 보여주었다.

[0363]

표 7은 재발 환자에서의 CD19/CD20 발현을 보여준다.

[0364]

표 7 IHC에 의해 종양 조직에서 시험된 CD19/CD20 발현

	치료 이전	CCAR066 치료 후 재발
환자 (Pt.) No. 8	CD19(+) CD20(+)	CD19(+) CD20(+)
Pt. No. 21	CD19(+) CD20(+)	CD19(-) CD20(+)

[0365]

표 8 PK 프로파일 (AUC_{0~28일}, C최대, T최대, T최종), CAR-T 세포 용량 및 임상 반응의 관계.

Subj ID	용량 (10^6 CAR-T/kg)	최적의 반응	AUC _{0~28일}	C최대	T최대	T최종	추적 조사(일)
Pt. No.8	3	SD	7,530	708	10	60	60+
Pt. No.13	3	CR	201,811	30,290	10	28	28+
Pt. No.7	4	UE	223,932	57,478	31	60	60+
Pt. No.9	3	PR	537,713	38,316	7	57	57+
Pt. No.4	3	PR	607,007	89,655	12	84	84+
Pt. No.12	5	CR	727,947	83,494	8	28	28+
Pt. No2	2	CR	747,101	114,041	14	187	187+
Pt. No.3	2	CR	1,154,844	139,497	10	182	182+
Pt. No.5	3	CR	1,673,877	183,427	8	85	85+
Pt. No.6	3	CR	2,437,574	223,644	13	55	55+
Pt. No1	1	CR	2,580,272	259,462	14	104	257+
Pt.No.10	2	CR	2,953,074	308,343	11	55	55+
Pt. No.14	4	CR	3,143,662	302,300	14	28	28+
Pt. No.11	5	CR	8,117,064	715,187	28	28	28+

[0367]

말초 혈액에서의 C-CAR039 증식 & 확장은 종양 퇴행과 양의 상관관계가 있었다. C-CAR039 AUC(0~28일)와 C최대 사이의 초기의 양의 상관관계 추세 및 임상 반응이 관찰된다.

[0369]

표 9 SCHOLAR-1: 비-CAR T-세포 요법 사용시 불응성 DLBCL의 결과 (풀링된 후향적 분석)

결과	MDACC (n=165)	IA/MC (n=82)	LY.12 (CCTG) (n=106)	CORAL (n=170)	풀링 (n=523)
반응률, %	20	26	26	31	26
• CR	7	7	2	15	7
• PR	13	18	25	16	18
반응률 (카테고리), %					
• 원발성 불응성	NR	25	27	10	20
• ≥ 2차 요법에 대해 불응성	20	21	20	40	26
• ASCT 후 ≤ 12 mos 재발	19	35	NR	39	34
OS 중간값, mos	6.6	5.0	6.6	6.5	6.3

[0370]

문헌 [Crump. Blood. 2017; 130:1800.]

[0372]

표 10 시판용 항-CD19 CAR-T 제품과 C-CAR039 비교

	ZUMA-1[1] (n=101)	JULIET[2] (n=111)	TRANSCEND NHL 001[3] (n=269**)	C-CAR039 (n=25)
연령 중간값, yrs (범위)	58 (23-76)	56 (22-76)	63 (54-70)	54 (28-71)
DLBCL (HGBL 포함), %	76	79	64	88
ECOG 0/1, %	100	100	99	100
≥ 3 선행 요법, %	69	51	51	60
IPI 3/4, %	48	-	-	24
엔 아버 단계 III/IV, %	85	76	-	76
선 행 ASCT, %	21	49	33	20
마지막 선 행 요법에 대한 PD 또는 SD로서의 최적의 반응, %	66(PD)	55	75 (PD,SD,PR)	80
ORR, %	82 (최적)	52 (최적)	73 (최적)	92 (최적)
CR, %	58 (최적)	40 (최적)	53 (최적)	84 (최적)
등급 ≥ 3 CRS/NE, %	13*/31†	22‡/12†	2†/10	4/0
토실리주맙/스테로이드 사용, %	43/27	14/10	18/10	14/12

[0373]

** 효능 평가 가능한 세트에 256 포함. * Lee 척도 따름. † CTCAE V4.03 따름. ‡ Penn Scale 따름. § ASTCT 따름.

[0375]

문헌 1. [Neelapu. NEJM. 2017; 377:2531]. 2. [Schuster. NEJM. 2019; 380:45]. 3. [Schuster. NEJM. 2019; 380:45].

[0376]

표 11 다른 CD19/CD20 이중특이적 CAR-T 제품과 C-CAR039 비교

	나라브 N. Shah[1] (n=22)	통 C[2] (n=28)	C-CAR039 (n=25)
연령 중간값, yrs (범위)	57 (38-72)	≥60 (25%)	54 (28-71)
DLBCL (HGBL 포함), %	50	57	88
ECOG 0/1, %	100	54	100
≥ 3 선행 요법, %	-	79	60
엔 아버 단계 III/IV, %	-	82	76
선 행 ASCT, %	37	18	20
마지막 선 행 요법에 대한 PD 또는 SD로서의 최적의 반응, %	82	86	80
ORR (최적), %	82	79	92
CR (최적), %	64	71	84
등급 ≥ 3 CRS/NEs, %	5/14	14/0	4/0
토실리주맙/스테로이드 사용, %	-	-	14/12

[0377]

C-CAR039는 r/r NHL 환자를 대상으로 한 임상 시험에서 유망한 효능 및 바람직한 안전성 프로파일을 나타낸다. 효능은 바람직하게 항-CD19 CAR-T 요법과 유사하다.

[0379]

실시예 11 C-CAR066 (CAR-T20.19 (OF))의 I상 임상 시험

[0380]

CD19 표적화된 에피토프의 손실에 기인하는 재발은 CD19 CAR-T 요법의 치료적 도전과제를 제시한다. 이 환자들은 일반적으로 결과가 불량하다. CD20은 B-세포 비-호지킨 림프종 (B-NHL)에 대한 입증된 치료 표적으로, 이전에 승인받고, 널리 사용되는 모노클로날 항체 요법에 의해 지원된다. C-CAR066은 새로운 제2 세대 키메라 항원 수용체 T (CAR-T) 요법이다. 임상전 연구에 따르면, (오파투무맙의 scFV로부터 유래된) C-CAR066은 Leu16, 리툭시맙(Rituximab), 및 오비누투주맙의 scFV로부터 유래된 CAR-T와 비교하여 우수한 항-종양 활성을 갖는다.

[0381] NCT04036019는 이전에 항-CD19 CAR-T 요법으로 치료를 받았던 r/r B 세포 램프종을 앓는 대상체에서 C-CAR066의 안전성 및 효능을 평가하기 위한 단일 아암, 단일 센터, 비-무작위 I상 임상 시험이다. 본 연구의 1차 목적은 치료 후 발생하는 유해 사례의 발생률 및 중증도를 평가하는 것이다. 2차 목적은 전체 반응률(ORR), PFS, 및 OS 측정을 포함한다. C-CAR066은 무혈청, 반자동, 디지털 폐쇄 시스템에서 제조된다. C-CAR066은 표준 3일 사이클로포스파미드/플루다라빈 컨디셔닝 요법 후에 단일 정맥내 용량으로 환자에게 투여된다.

[0382] 도 14는 C-CAR066-NHL 연구 디자인을 보여주는 것이다.

[0383] 2020년 8월 3일 현재 7명의 환자 (모든 DLBCL)가 등록하였고, 2.0×10^6 내지 5.0×10^6 개의 CAR-T 세포의 용량 범위로 C-CAR039를 주입받았다. 제조 성공률은 100%였다. 모든 환자는 항-CD19 CAR-T 치료 후 재발했으며, 환자 중 단 1명만이 항-CD-19 CAR-T 요법 후 CR을 달성하였다.

표 12 환자의 임상적 특징

파라미터	상하이 통지 병원(shanghai tongji hospital)						
	C006	C007	C010	C012	C013	C014	C015
연령	51	43	62	50	61	49	45
성별	남성	남성	여성	여성	남성	여성	여성
용량군	3	3	2	3	3	4.8	3
NHL 유형	DLBCL	DLBCL	DLBCL	DLBCL	DLBCL	DLBCL	DLBCL
ECOG	1	1	1	1	1	1	1
병기	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	UK	N/A
IPF	UK	2	UK	UK	UK	UK	2
선행 요법수	4	5	6	3	6	4	6
선행 요법	1.R-CHOP*3 PR 2.CHOP*1 PD 3.ESHAP*1	1.R- CHOP*6 CR 2.R- MINE*2 PR 3.I-ICE*1 SD	1.R-CHOPE*2 SD 2.R-DHAP*1 SD	1.R- CHOP*8 CR 2.ASCT*1 CR 2.Radiation	1.R- CHOP*6 CR 2.RZ- ICE*6 CR 2.RZ- EPDCCH*3 PR (DLBCL)	1.R- CHOP*6 +R*2 CR 3.CD19 CART CR 3.R- ESHAP*2	1.LEN*4 PR(FL) 2.RZ- EPDCCH*3 PR (DLBCL) 3.Hyper- CVAD-B*1 PD 4.R- GEMOX*2 SD 5.CD19/22 CART SD 6.R- GEMOX*1 PD 7.苯达莫司 汀*1 PD
최적의 반응	PR	CR	SD	CR	CR	CR	PR
CART-19 치료 시점	20-Jan-19	11-Nov-19	7-Dec-19	17-Jul-19	30-Dec-19	13-Jan-20	12-Jun-19
CART-19에 대한 반응	PR	SD	SD	CR	SD	PR	SD
초기 진단	31-Mar-18	31-Oct-18	May-19	Feb-18	8-Jun-18	Oct-18	23-Feb-17

[0385]

[0386] C-CAR066 치료는 내약성이 우수하였고, 6명의 환자에서 가역적인 1~2 등급 CRS, 또 다른 환자에서 3등급 CRS가 나타났고, 신경독성 이벤트는 없었다. 7명의 환자 중 6명이 임상적 개선 (최적의 전체 반응률, ORR = 85.7%)을 보였다. 최적의 전체 반응은 3건의 CR 및 3건의 PR을 포함한다. 모든 환자가 C-CAR066 치료에 반응하였고, 상이한 정도의 종양 퇴행을 보였다 (45-100%).

[0387]

표 13 C-CAR066 치료 후 발생하는 유해 사례 요약

파라미터	상하이 통지 병원						
	C006	C007	C010	C012	C013	C014	C015
시토카인 방출 증후군	1 등급	3 등급	2 등급	1 등급	1 등급	1 등급	1 등급
신경독성	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
호중구감소증	3 등급	4 등급	4 등급	2 등급	3 등급	3 등급	
혈소판감소증	없음	4 등급	4 등급	2 등급	없음	2 등급	
빈혈	3 등급	3 등급	3 등급	1 등급	1 등급	2 등급	
감염	없음	2 등급	없음	없음	없음	2 등급	

[0388]

[0389] 7명의 환자 중 6명이 임상적 개선 (최적의 전체 반응률, ORR = 85.7%)을 보였다. 최적의 전체 반응은 3건의 CR 및 3건의 PR을 포함한다. 모든 환자가 C-CAR066 치료에 반응하였고, 상이한 정도의 종양 퇴행을 보였다 (45-100%).

[0390]

표 14 C-CAR066 임상 효능 요약

파라미터	상하이 통지 병원						
	C006	C007	C010	C012	C013	C014	C015
4w	PR 감소 74.3%	PR 감소 53.9%	SD 감소 40.7%	SD 감소 45.5%	PR 감소 51.6%	PR 감소 70.3%	PR 감소 84%
8w	PR 감소 77.2%	PR 감소 73.3%	SD 감소 49.5%	SD	PR		
12w	PD (PET-CT) 새 병변	CR (PET-CT) 감소 70.7%					

[0391]

[0392] 도 15는 C-CAR066 치료 이전 및 이후의 환자의 PET-CT의 예를 보여주는 것이다.

[0393]

C-CAR066은 CD19 CAR-T 요법 후 r/r NHL 환자에서 바람직한 안전성 프로파일을 갖고, 유망한 조기 효능을 나타낸다. C-CAR066은 항-CD-19 CAR-T 요법과 비교하여 상이한 작용 기전을 갖는 것으로 나타났다. CD20 및 CD19 종양 항원, 둘 모두를 표적화함으로써, B 세포 악성종양 환자에서 CD19 또는 CD20만을 단독으로 표적화하는 것보다 우수한 임상적 이점을 얻을 수 있다.

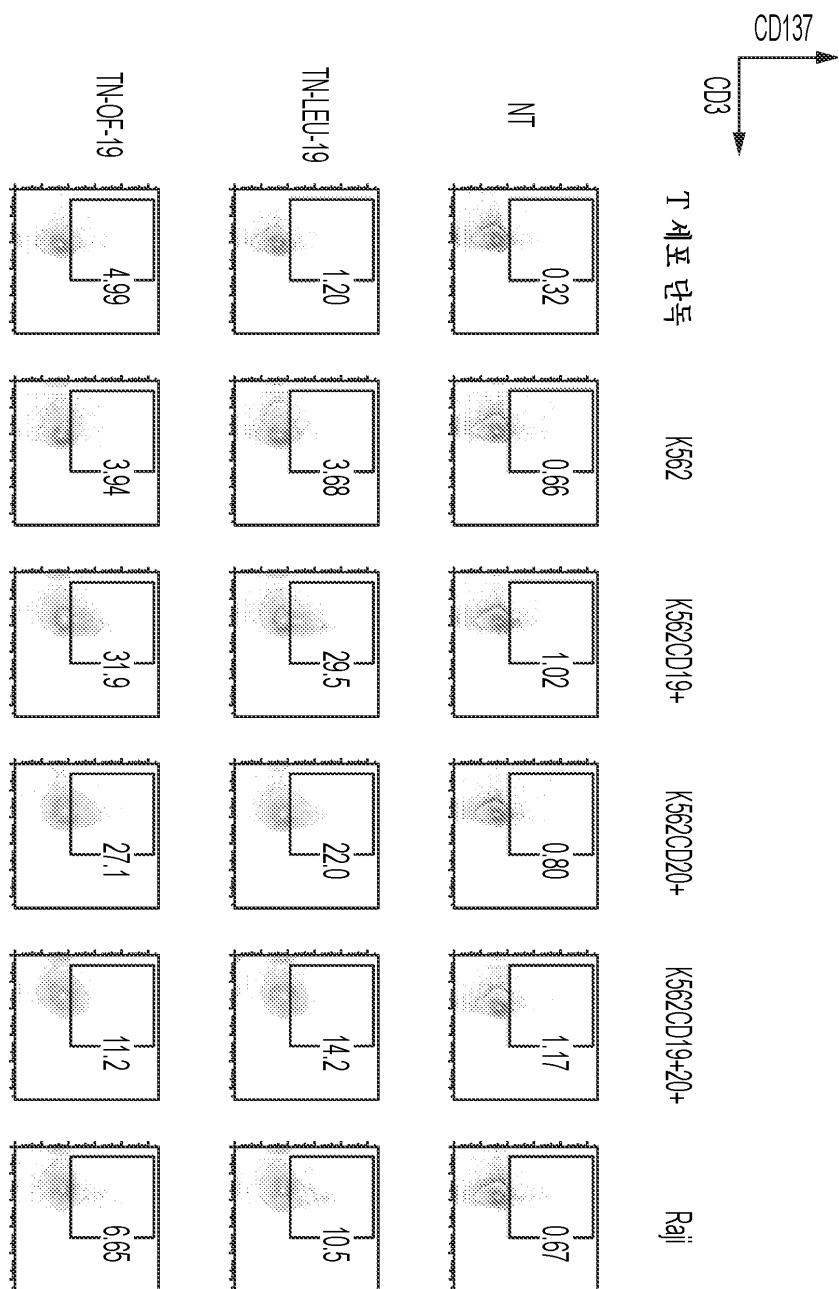
[0394]

본 발명의 범주는 본원 상기에서 구체적으로 제시되고, 기술된 것으로 제한되지 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 물질, 구성, 구축 및 크기에 대하여 예시된 예에 대한 적합한 대안이 있다는 것을 인식할 것이다. 특히 및 다양한 간행물을 비롯한 수많은 참고문헌이 본 발명의 설명에서 인용 및 논의된다. 그러한 참고문헌의 인용 및 논의는 단지 본 발명의 설명을 명확히 하기 위해 제공되며, 임의의 참고문헌이 본원에 기술된 발명에 대한 선행 기술임을 인정하는 것은 아니다. 본 명세서에서 인용되고 논의된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 정신 및 범주를 벗어나지 않고, 본원에 기술된 것의 변형, 수정 및 다른 구현을 착안해 낼 수 있을 것이다. 본 발명의 특정 실시양태가 제시되고, 기술되었지만, 본 발명의 정신 및 범주를 벗어남이 없이, 변경 및 수정이 이루어질 수 있다는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 전술한 설명 및 첨부 도면에 설명된 사항은 단지 예시로서 제공되는 것이며, 제한하는 것은 아니다.

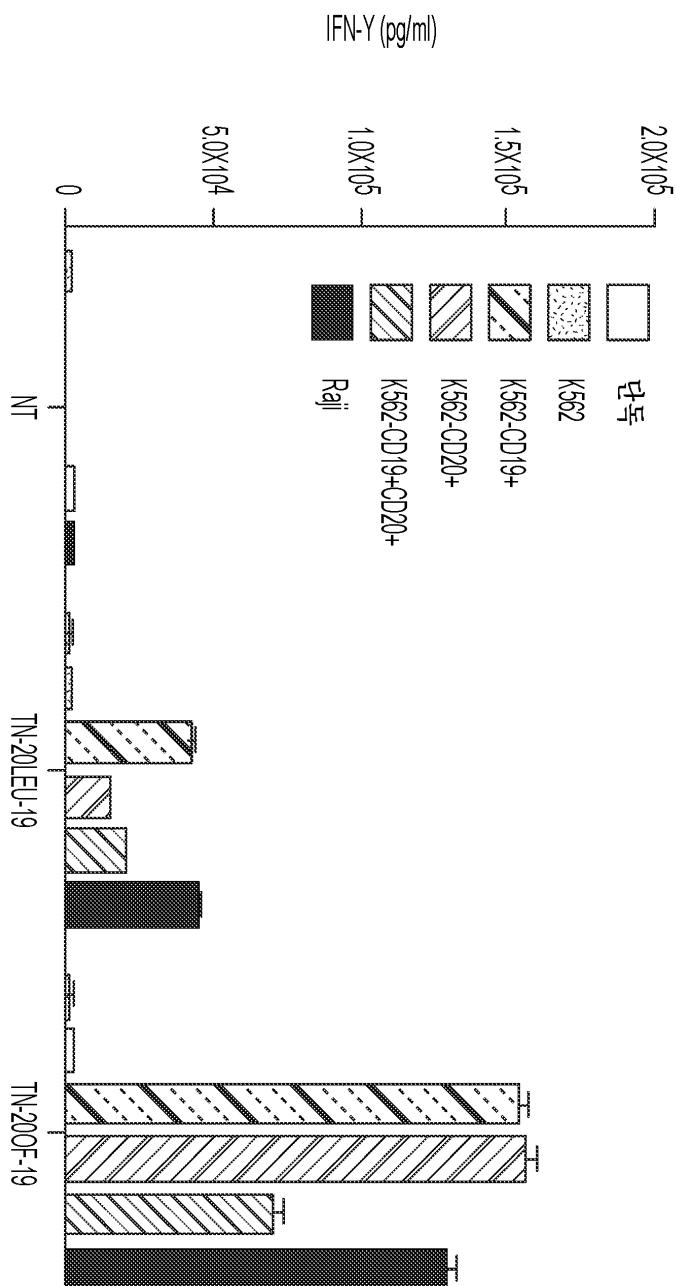
도면**도면1**

TN-201EL-19 (C-CAR039)	SP	Lem6(VL-VH)	링커	FMC63(VH-VL)	현지	CD28	4-1BB	CD3z
	SP	OF (VL-VH)	링커	FMC63(VH-VL)	현지	CD28	4-1BB	CD3z

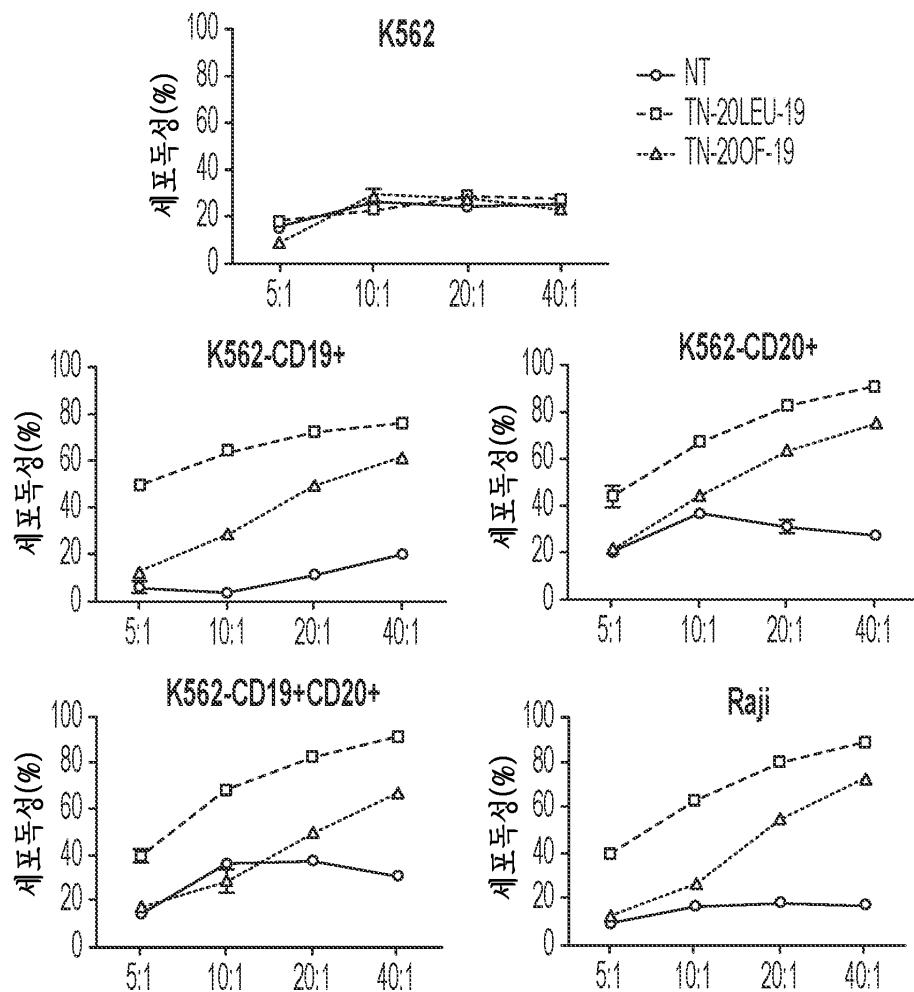
도면2a



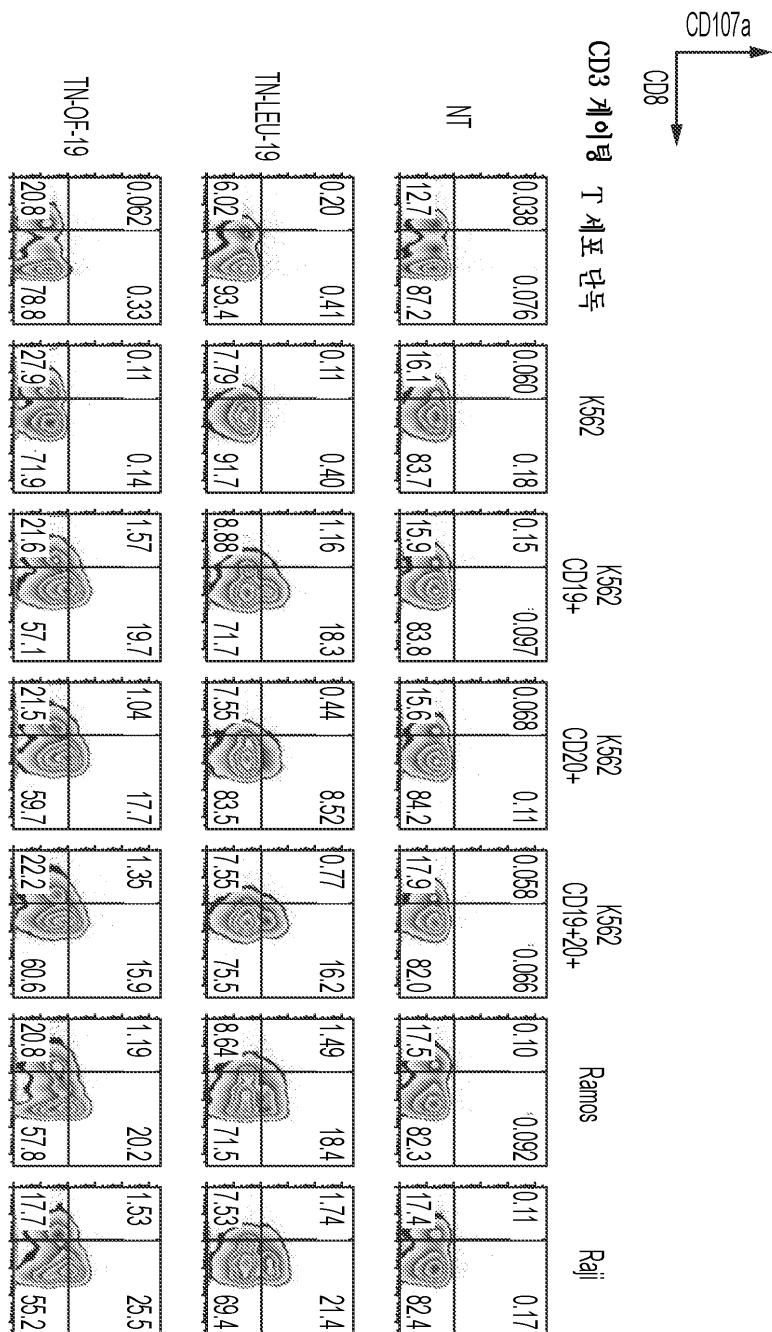
도면2b



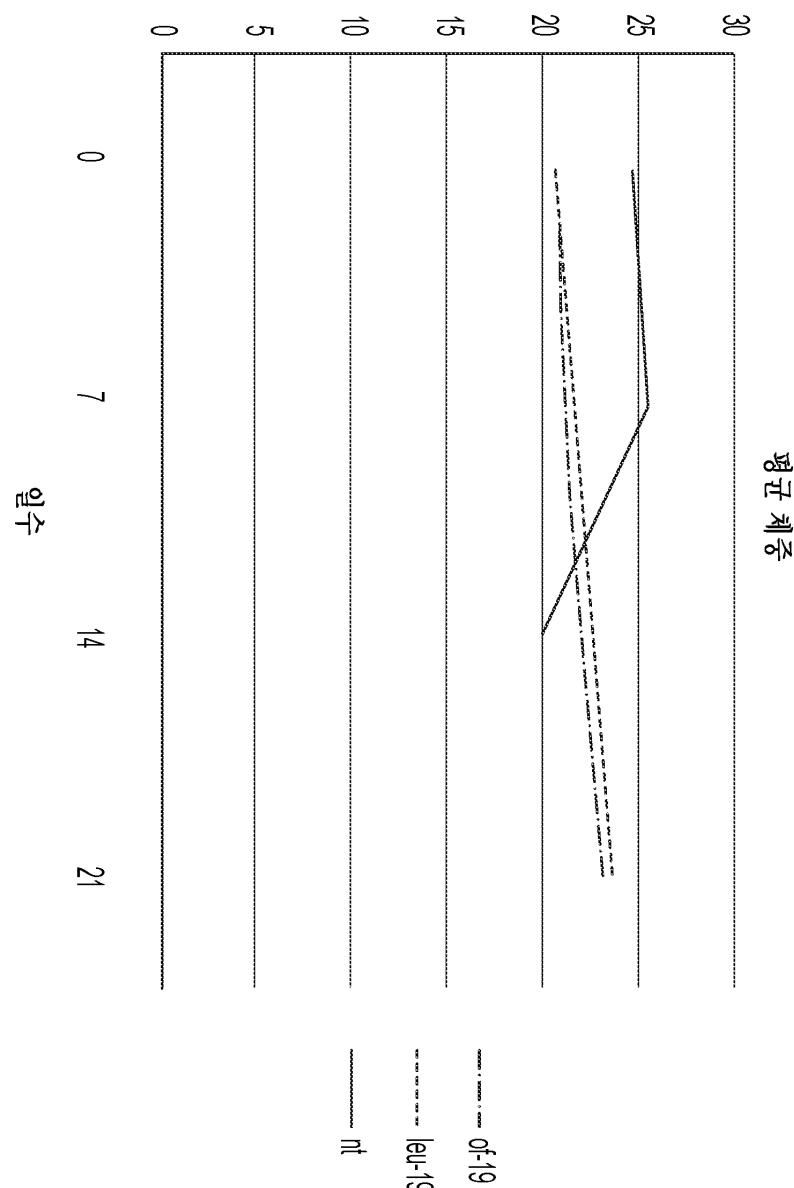
도면3a



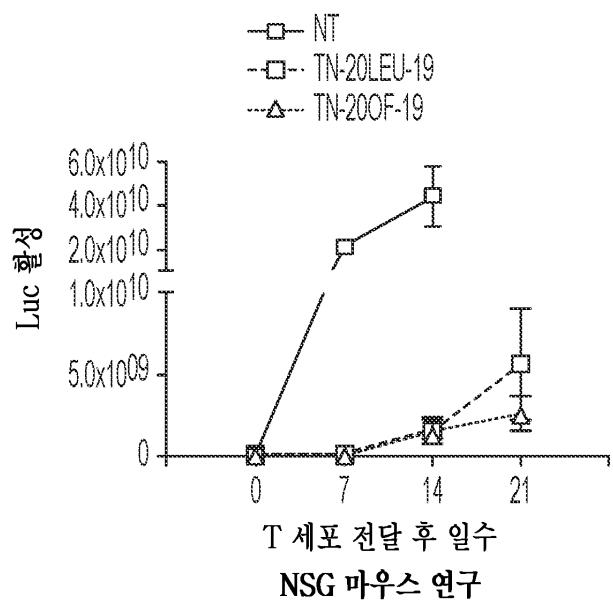
도면3b



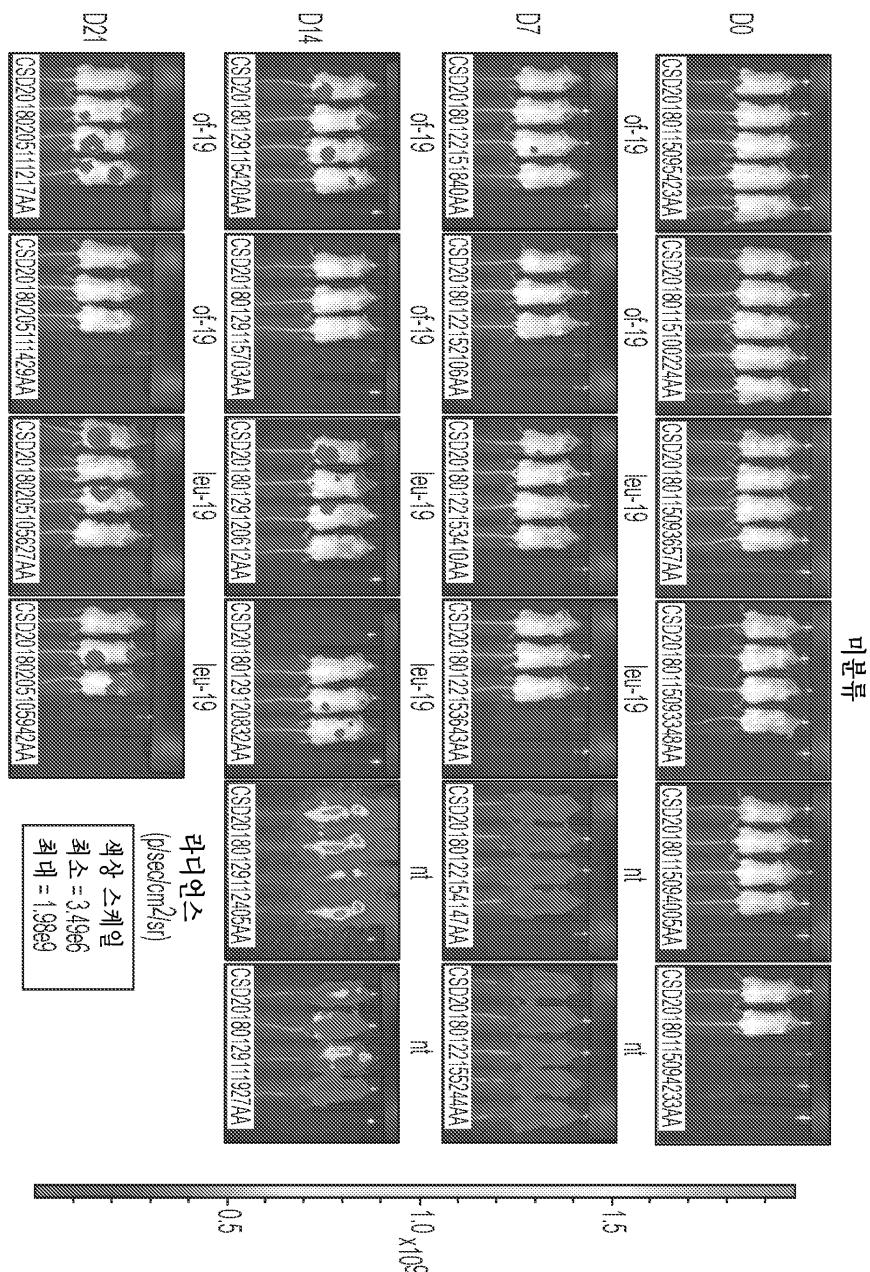
도면4a



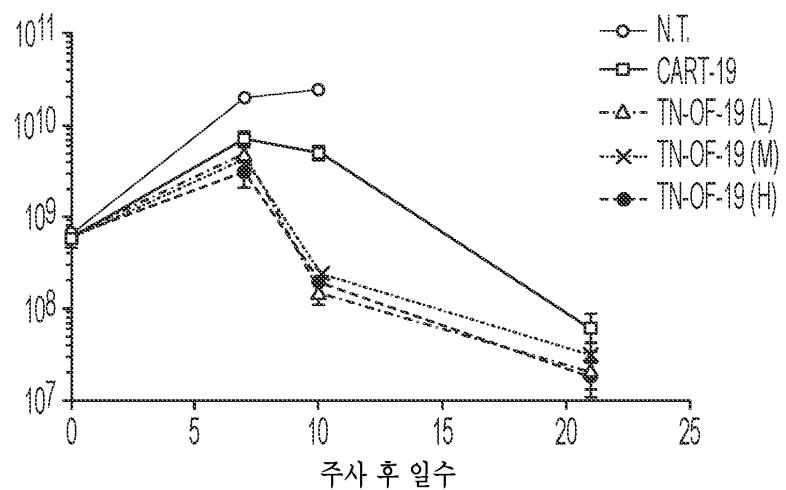
도면4b



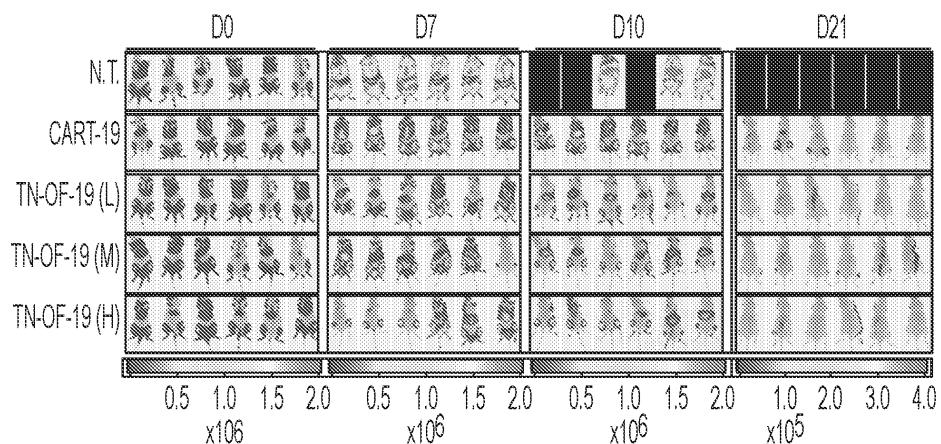
도면4c



도면5a



도면5b

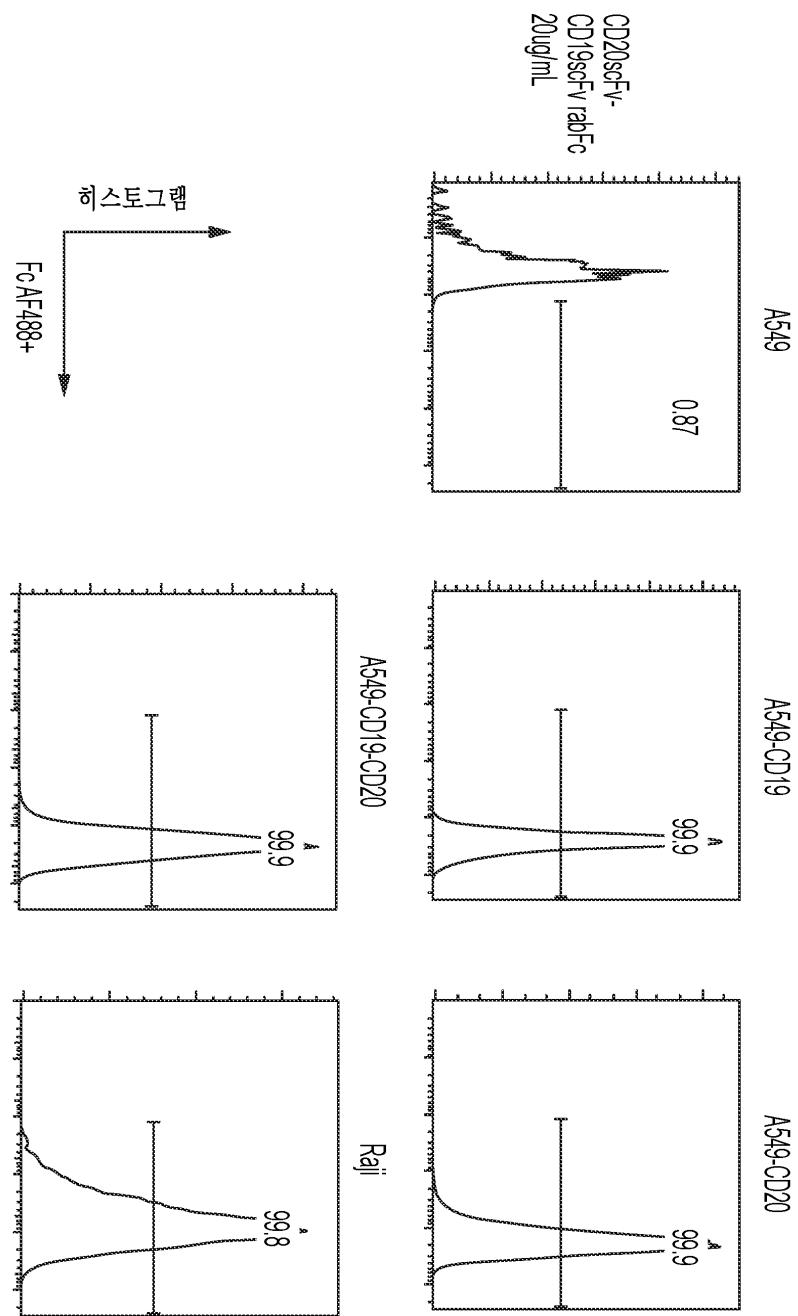


도면 6a

CD20scFv-
CD19scFv rabFc



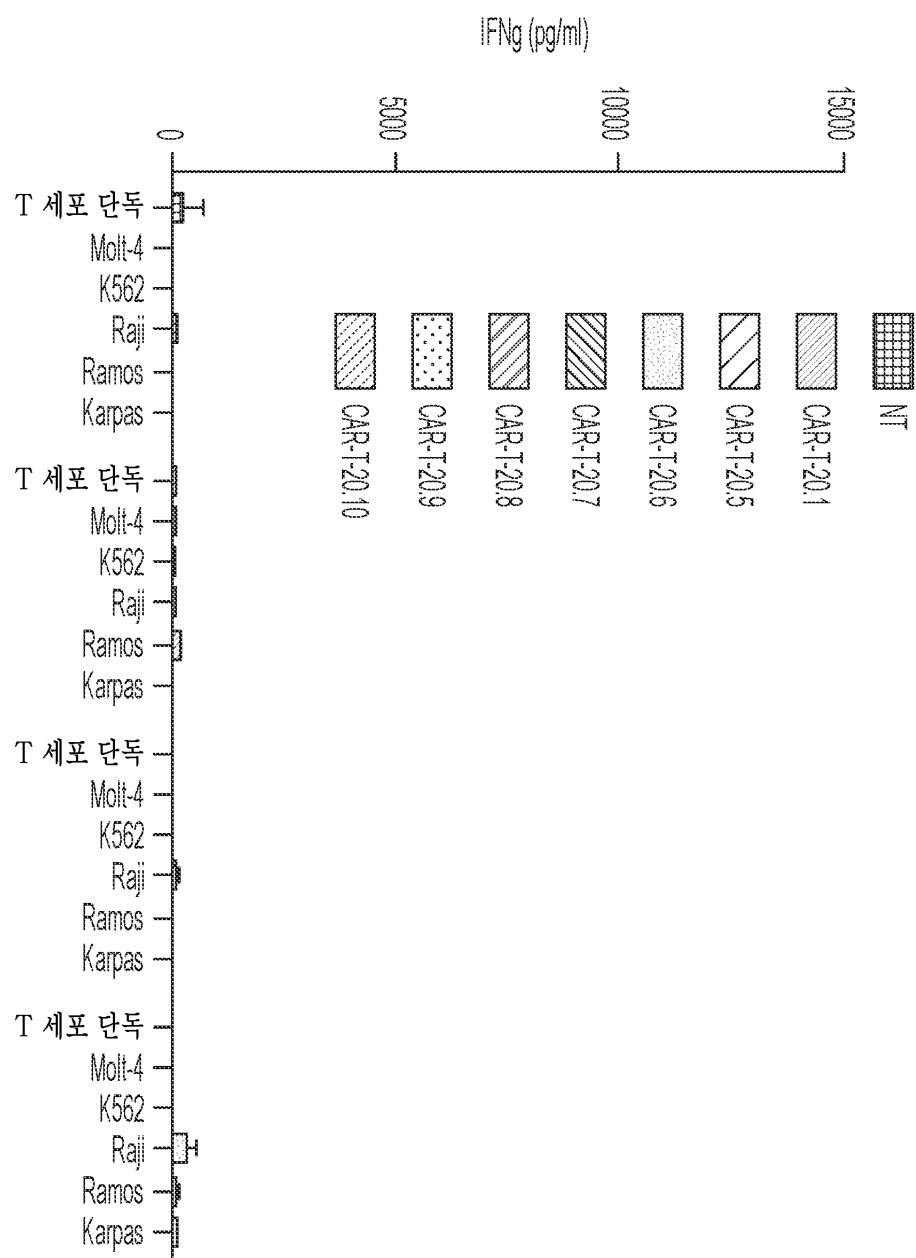
도면 6b



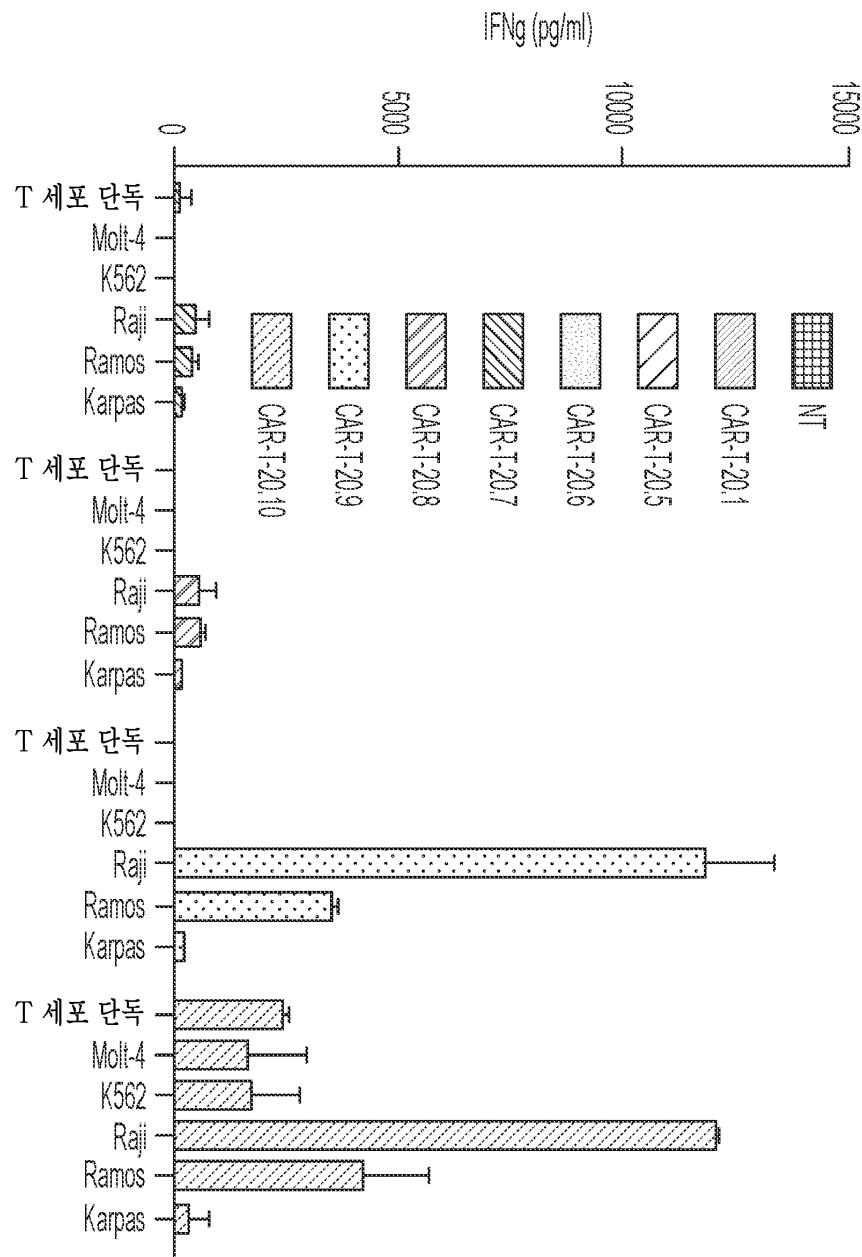
도면7

CAR-T20.1	<input type="checkbox"/>	AY160760 (VL-VH)	CD8 헌지	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.5	<input type="checkbox"/>	AY160760 (VL-VH)	CD8 헌지	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.6	<input type="checkbox"/>	AY160760 (VH-VL)	CD8 헌지	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.7	<input type="checkbox"/>	IDE-C2B8 (VL-VH)	CD8 헌지	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.8	<input type="checkbox"/>	IDE-C2B8 (VH-VL)	CD8 헌지	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.9	<input type="checkbox"/>	Leu16 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD28 TM	CD28	4-1BB	CD3z
CAR-T20.10	<input type="checkbox"/>	Leu16 (VH-VL) OP	헌지-CH2-CH3	CD28 TM	CD28	4-1BB	CD3z
CAR-T20.11	<input type="checkbox"/>	Leu16 (VL-VH)	헌지-CH2-CH3	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.12	<input type="checkbox"/>	Leu16 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.13	<input type="checkbox"/>	오비누투주맙 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.14	<input type="checkbox"/>	오파투무맙 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.15	<input type="checkbox"/>	AY160760 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.16	<input type="checkbox"/>	리툭시맙 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.17	<input type="checkbox"/>	Leu16 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD28 TM	CD28	4-1BB	CD3z
CAR-T20.18	<input type="checkbox"/>	Leu16 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
CAR-T20.19	<input type="checkbox"/>	오파투무맙 (VH-VL)	헌지-CH2-CH3	CD8 TM	4-1BB	CD3z	
		L235E N297Q					

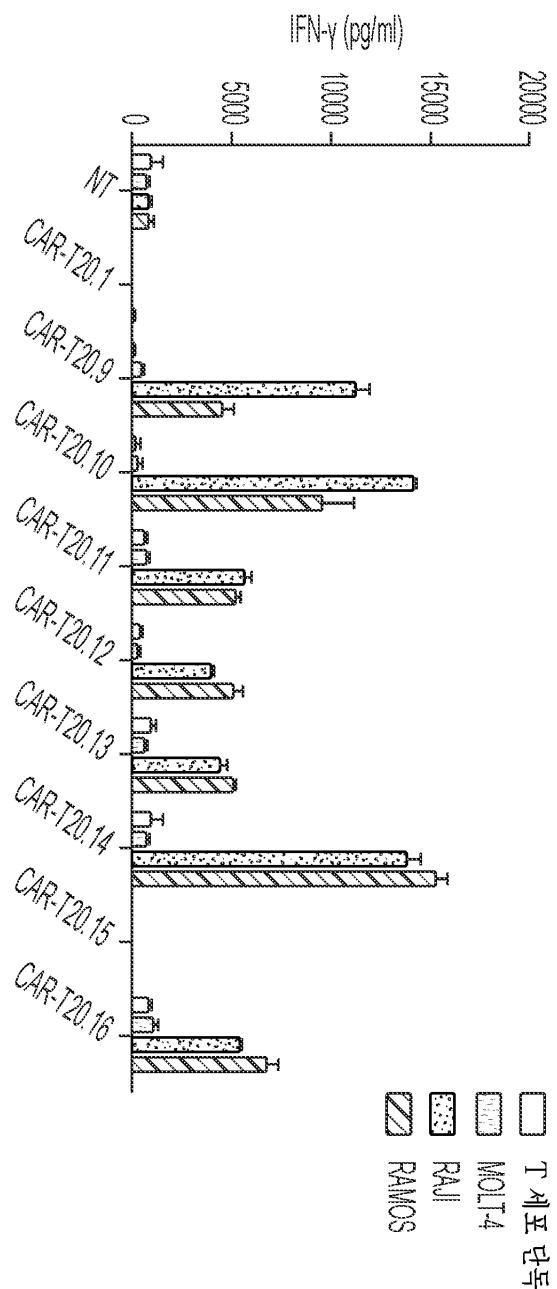
도면 8ai



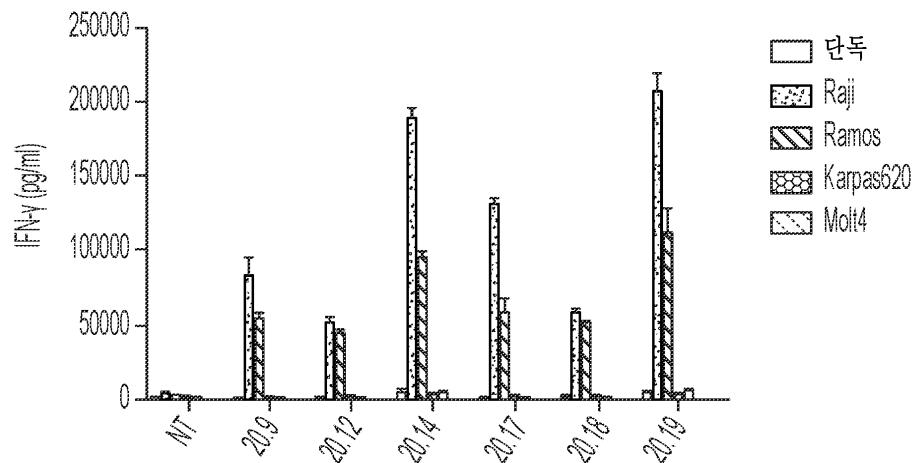
도면 8aai



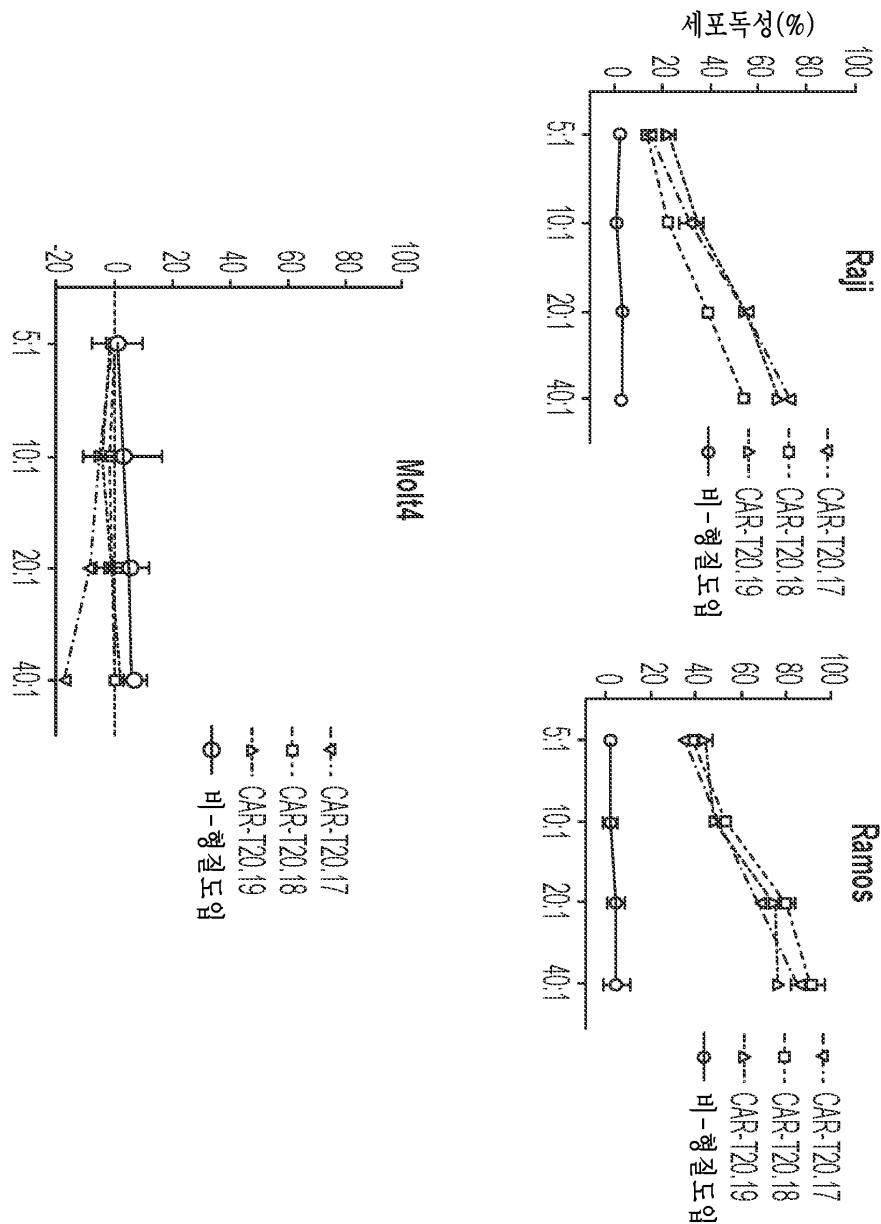
도면8b



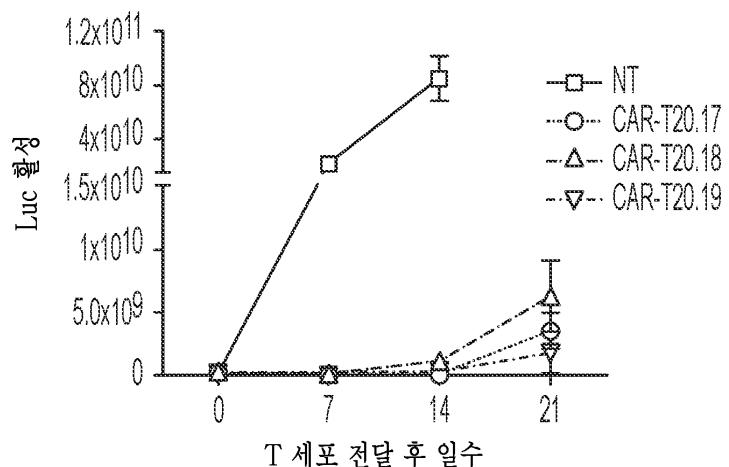
도면8c



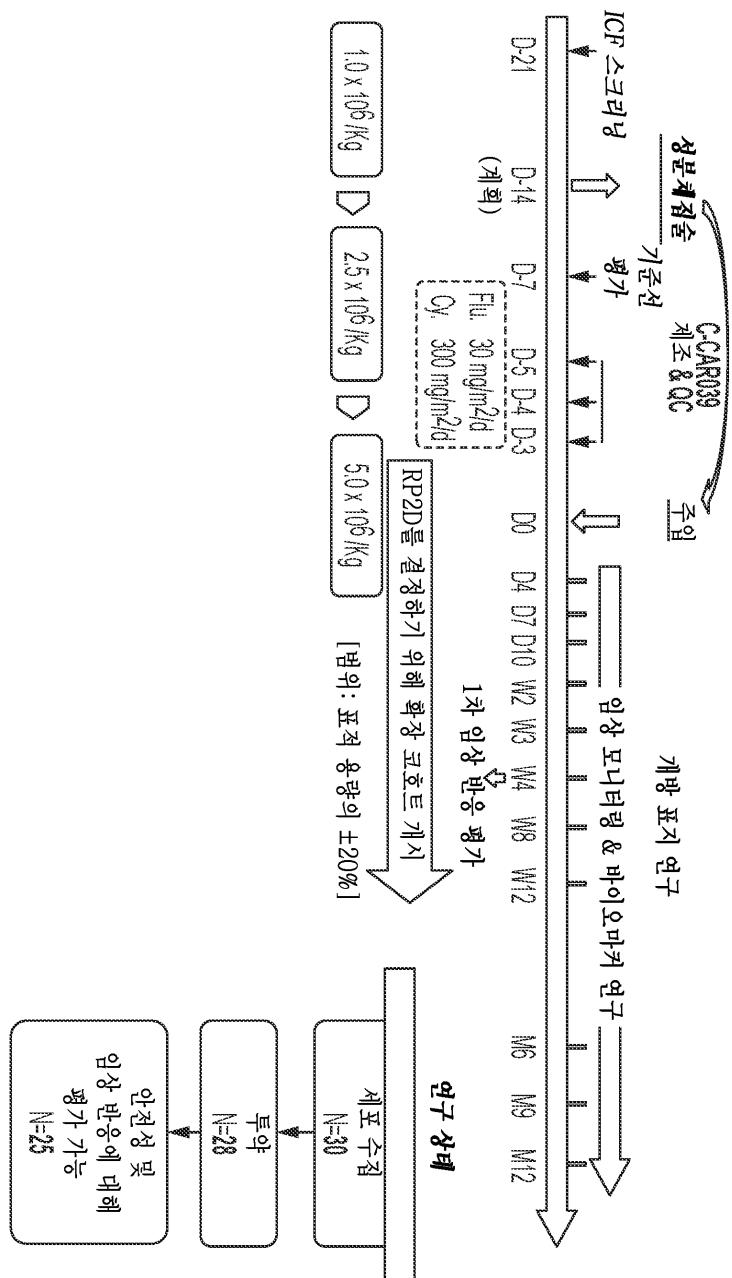
도면9a



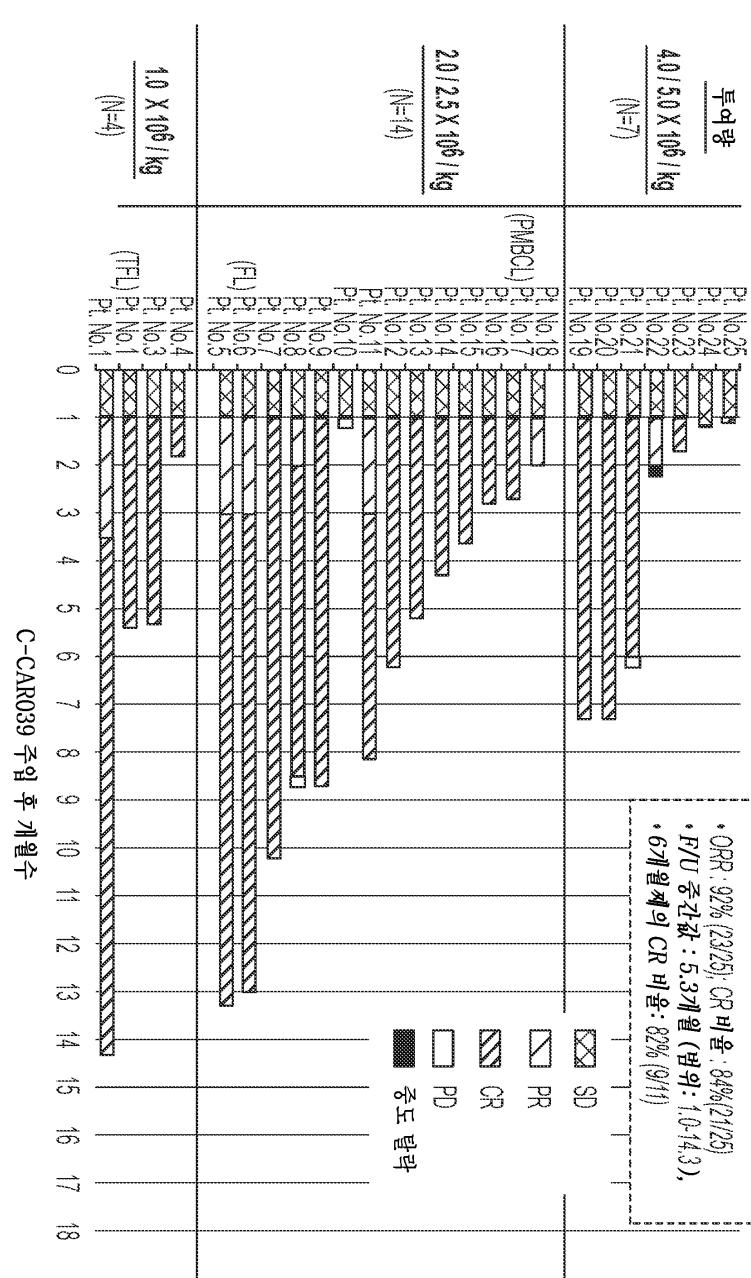
도면9b



도면10



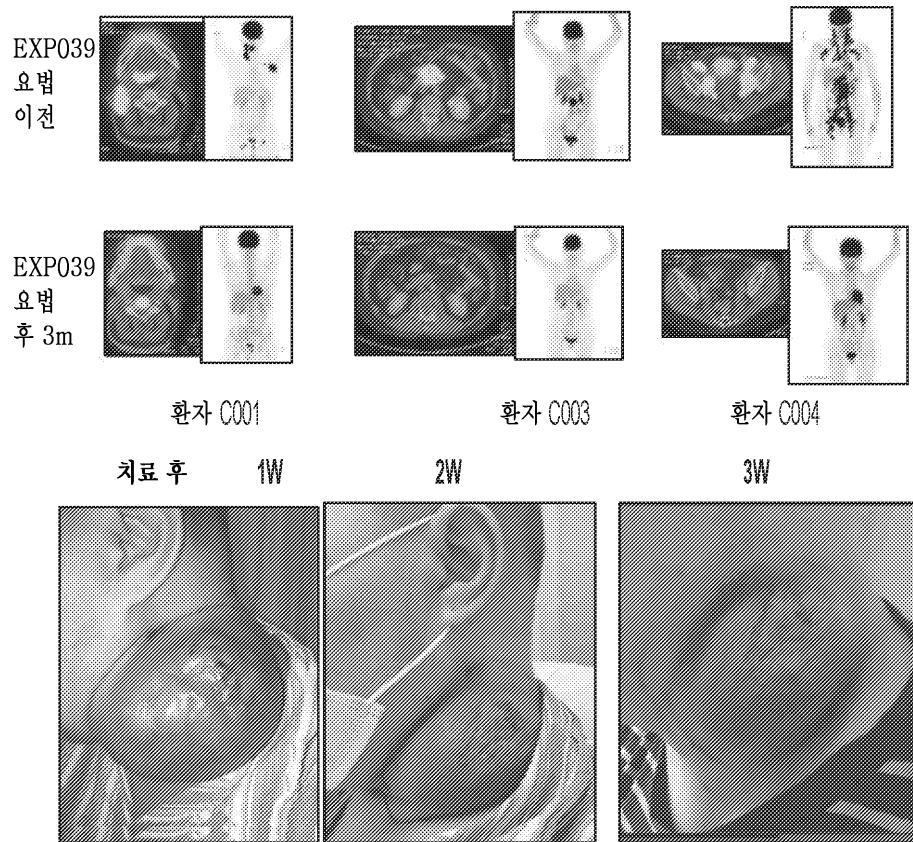
도면11



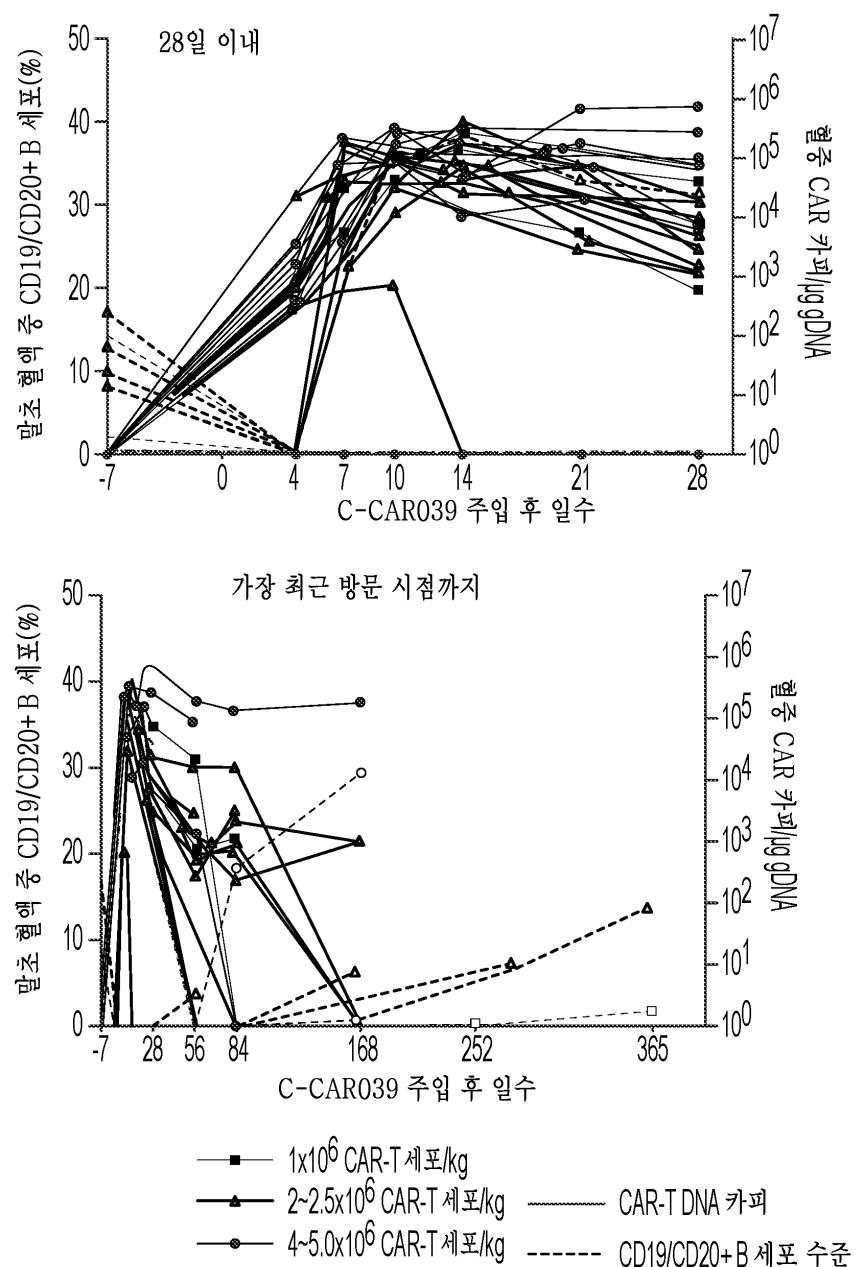
데이터 첫-오픽 일자: 2021년 1월 31일. 20세의 환자가 효능에 대해 평가 가능하다. Pt. No. 22는 SPM (AML)으로 인해 2개월제에 중도 탈락하였다.

C-CAR039 주입 후 개월수

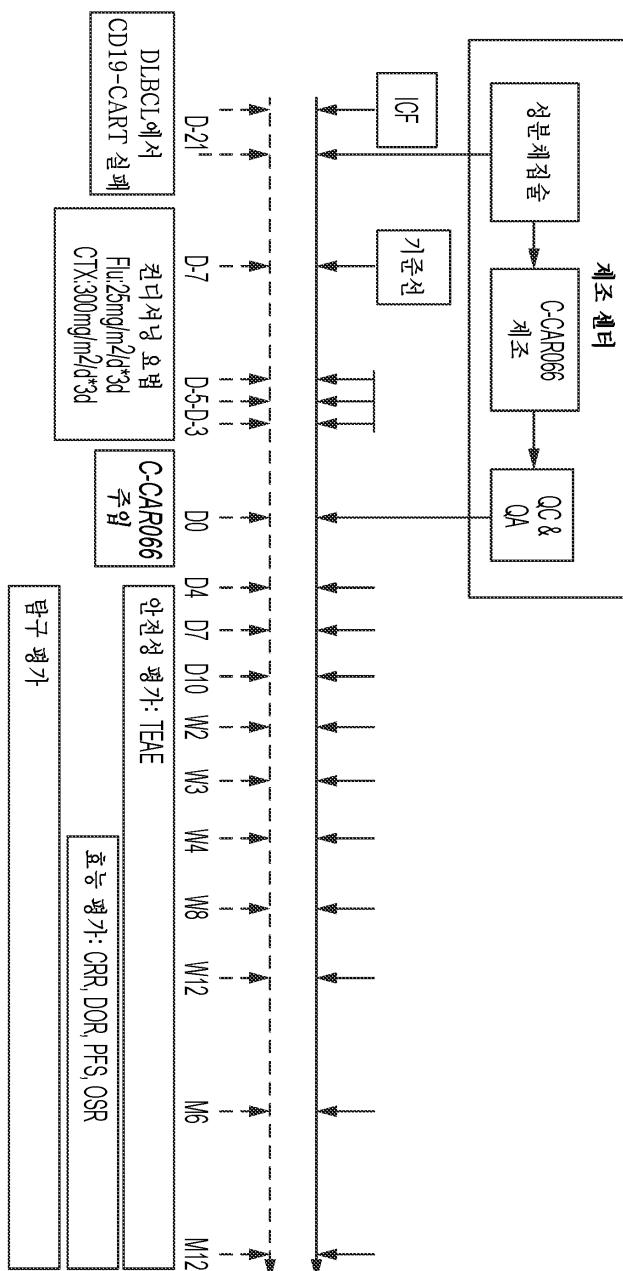
도면12



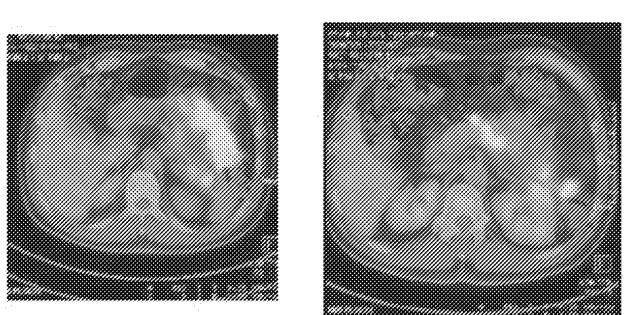
도면13



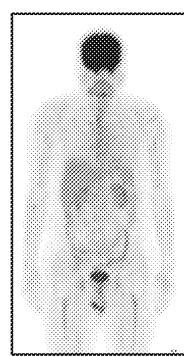
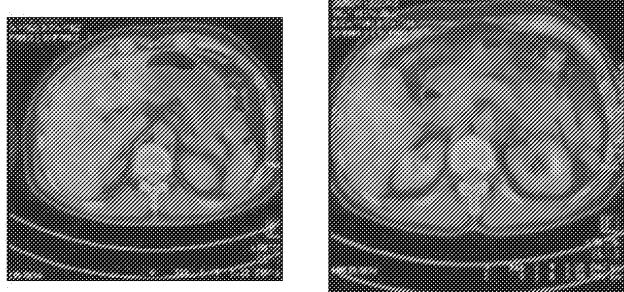
도면14



도면15

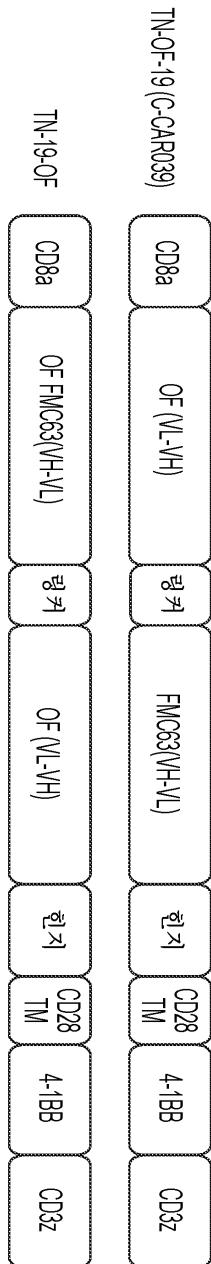


CD20 CAR-T 치료 이전

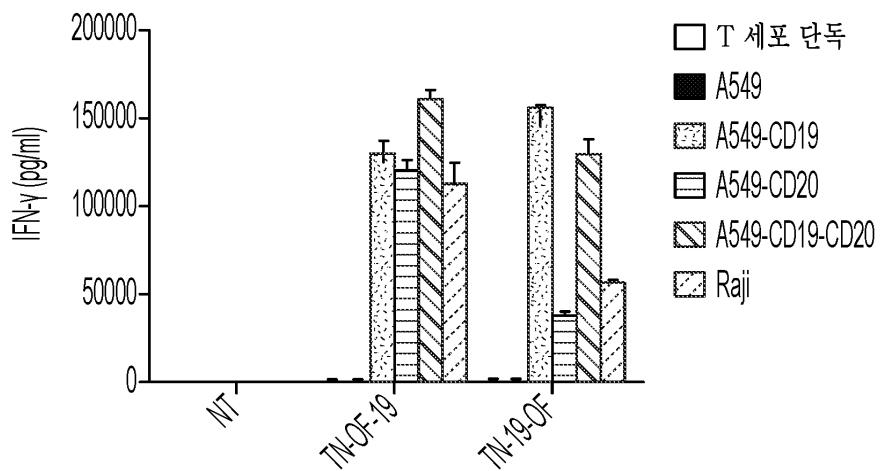


CD20 CAR-T 치료 후 3m

도면 16a



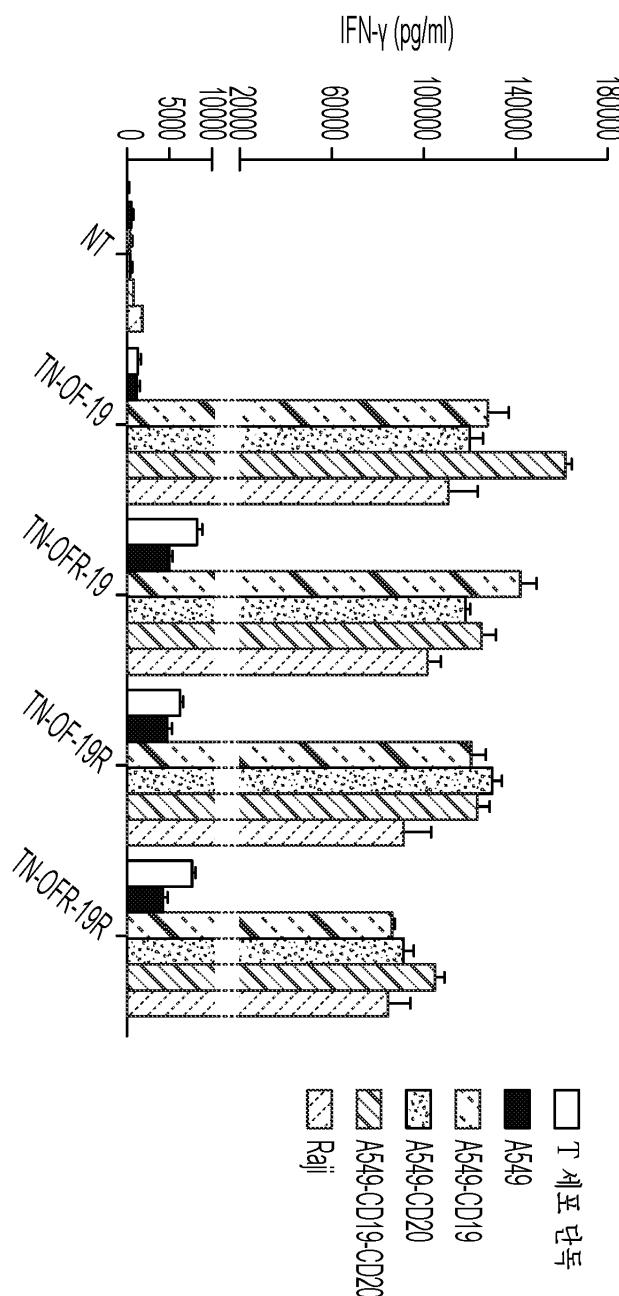
도면 16b



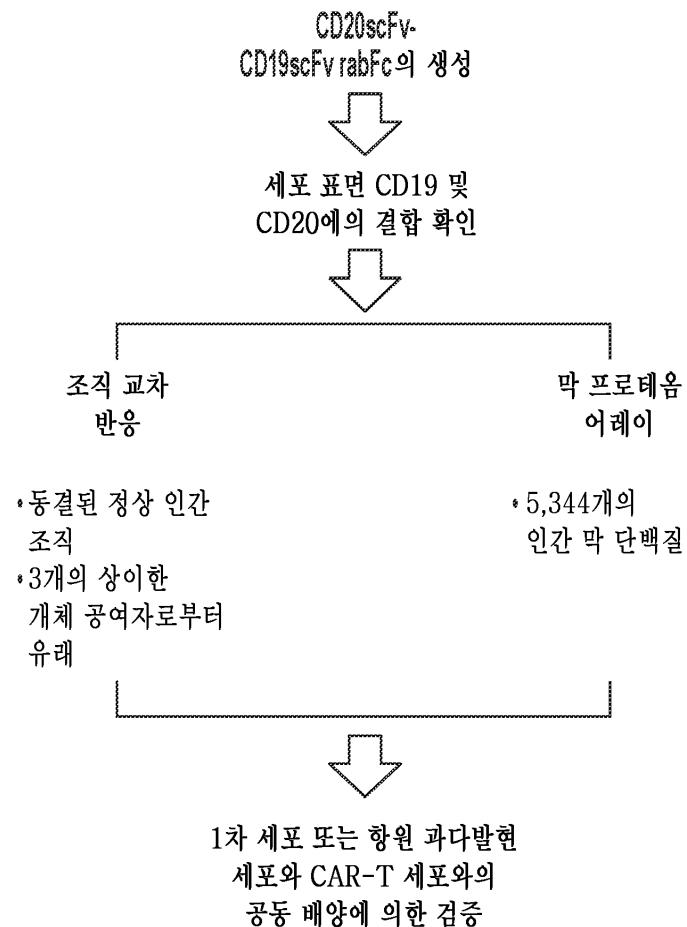
도면 16c

	TN-OF-19(C-CARO39)							
	CD8a	OF (VL-VH)	령커	FMC63(VH-VL)	흰자	CD28 TM	4-1BB	CD32
TN-OFR-19	CD8a	OF (VH-VL)	령커	FMC63(VH-VL)	흰자	CD28 TM	4-1BB	CD32
TN-OF-19R	CD8a	OF (VL-VH)	령커	FMC63(VL-VH)	흰자	CD28 TM	4-1BB	CD32
TN-OFR-19R	CD8a	OF (VH-VL)	령커	FMC63(VL-VH)	흰자	CD28 TM	4-1BB	CD32

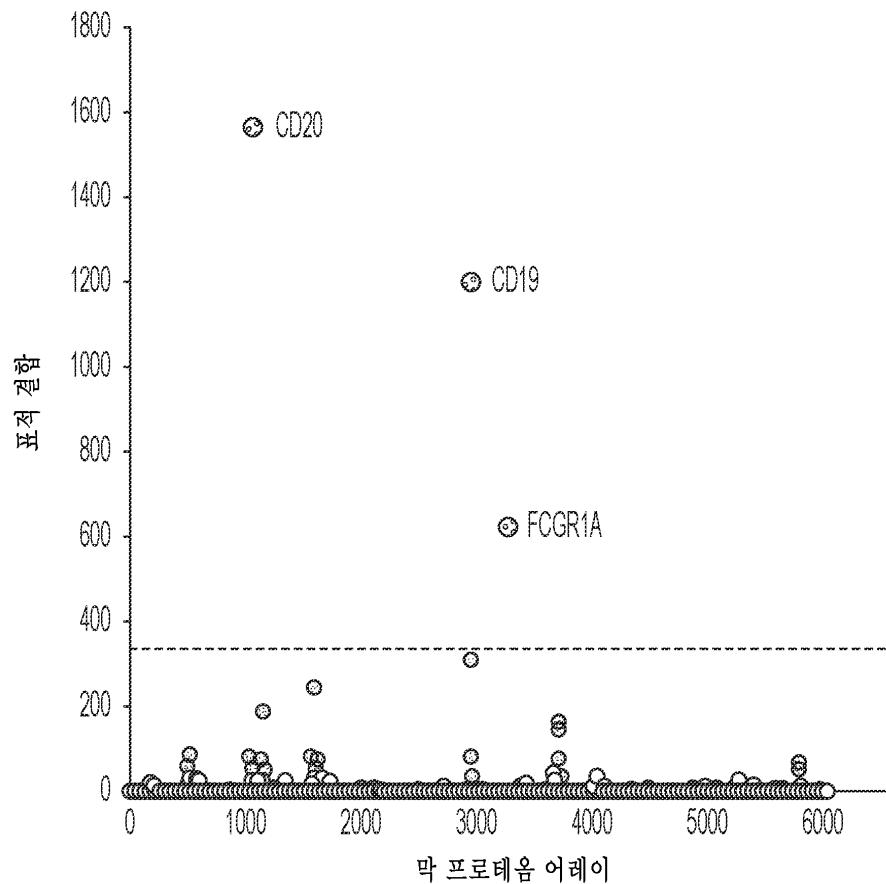
도면 16d



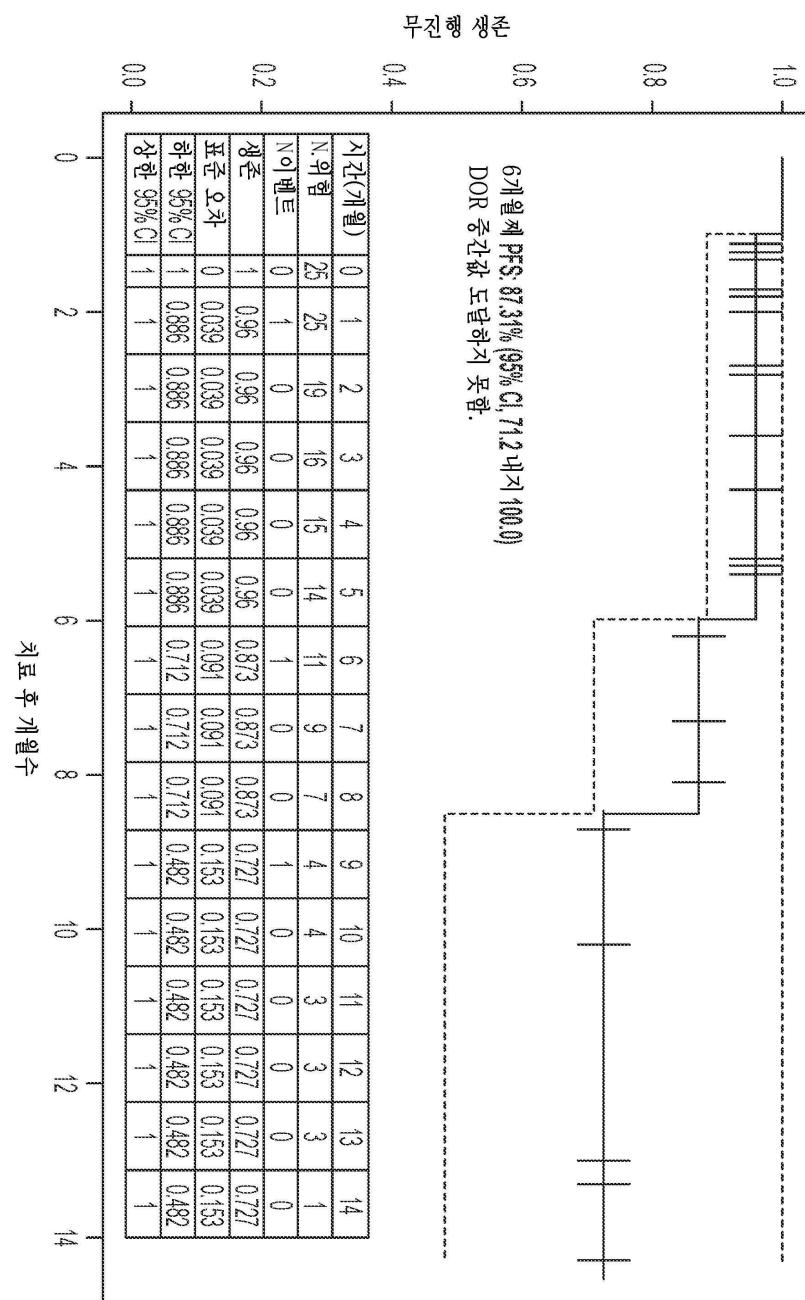
도면17a



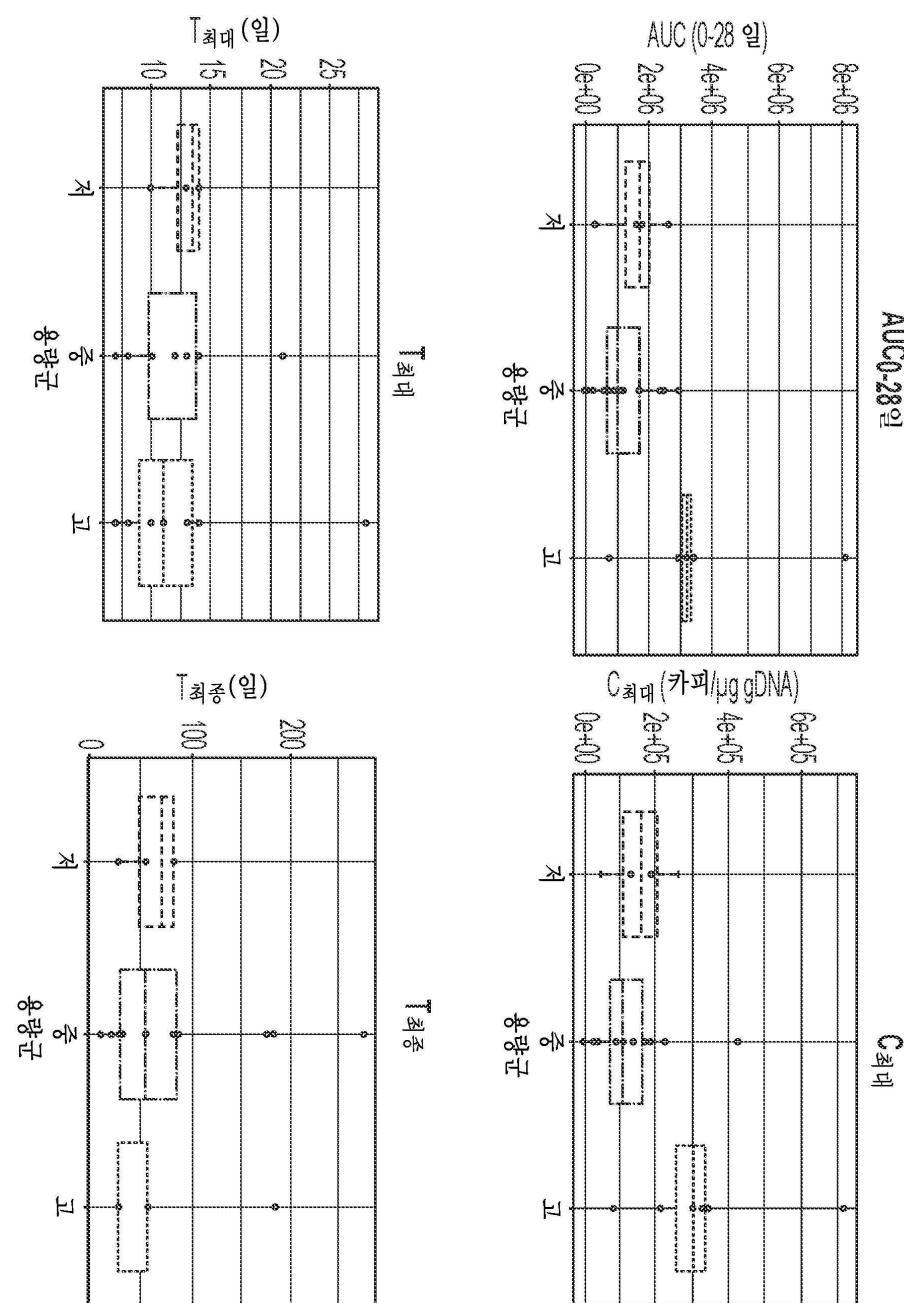
도면 17b



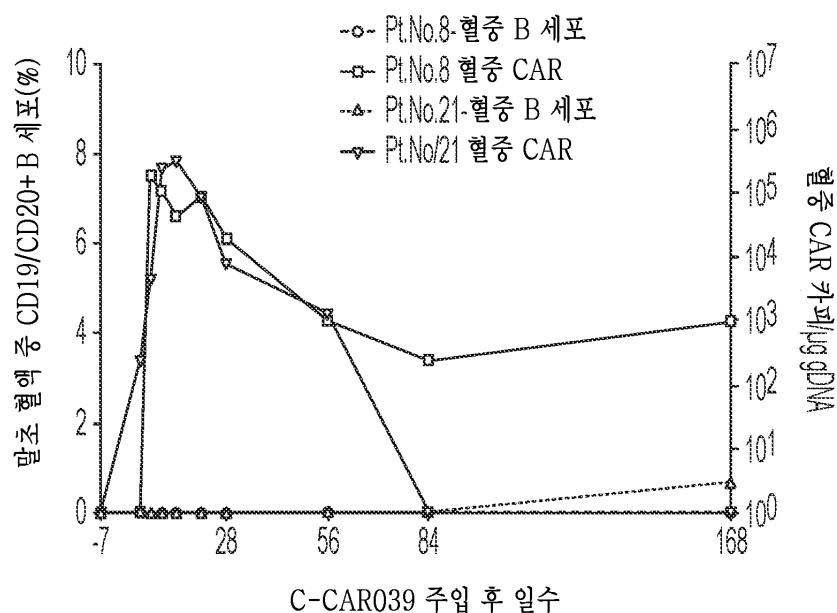
도면18



도면19



도면20



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CELLULAR BIOMEDICINE GROUP HK LIMITED

SHANGHAI CELLULAR BIOPHARMACEUTICAL GROUP LTD.

WUXI CELLULAR BIOPHARMACEUTICAL GROUP LTD.

Cellular Biomedicine Group Inc.

<120> Combined chimeric antigen receptor targeting CD19 and CD20 and application thereof

<130> 11299/008882-W01

<150> CN202010188038.1

<151> 2020-03-17

<150> US16/877,069

<151> 2020-05-18

<150> PCT/CN20/109645

<151> 2020-08-17

<150> US63/154,032

<151> 2021-02-26

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain sequence of single-chain variable region (VH) derived from Leu16 antibody

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain sequence of single-chain variable region (VL) derived from Leu16 antibody

<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met

20 25 30

Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain sequence of single-chain variable region (VH) derived from Ofatumumab antibody

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain sequence of single-chain variable region (VL) derived from Ofatumumab antibody

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the light chain of single-chain variable region (VL) derived from FMC63 antibody

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100 105

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the heavy chain of single-chain variable region (VH) derived from FMC63 antibody

<400> 6

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Linker sequences
<400> 7
Gly Gly Gly Gly Ser

1 5
<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Leader sequence of CD8 antigen
<400> 8

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> hinge region
<400> 9

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 10
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD8 transmembrane region
<400> 10
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 transmembrane region

<400> 11

Met Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Co-stimulatory factor signal region derived from 4-1BB

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 13

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Co-stimulatory factor signal region derived from CD28

<400> 13

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signaling region of CD3??

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 15

<211> 710

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of TN-LEU-19

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 35 40 45

Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 50 55 60
 Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95
 Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser
 115 120 125
 Thr Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
 130 135 140
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 145 150 155 160
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240

Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Glu

260	265	270
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser		
275	280	285
Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly		
290	295	300
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly		
305	310	315
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser		
325	330	335
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys		
340	345	350
Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys		
355	360	365
His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
370	375	380
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro		
385	390	395
Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr		
405	410	415
Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys		
420	425	430
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys		
435	440	445
Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His		
450	455	460
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr		
465	470	475
Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe		
485	490	495
Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys		
500	505	510

Leu Glu Ile Thr Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 515 520 525

Met Phe Trp Val Leu Val Val Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
 530 535 540

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg
 545 550 555 560

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 565 570 575

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 580 585 590

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 595 600 605

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 610 615 620

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 625 630 635 640

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 645 650 655

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 660 665 670

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 675 680 685

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 690 695 700

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 705 710

<210> 16

<211> 712

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of TN-OF-19

<400> 16

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

35 40 45

Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg

100 105 110

Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

115 120 125

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro

145 150 155 160

Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn

165 170 175

Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

180 185 190

Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp

195 200 205

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser

210 215 220

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

245	250	255
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
260	265	270
Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser		
275	280	285
Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp		
290	295	300
Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp		
305	310	315
Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu		
325	330	335
Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe		
340	345	350
Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys		
355	360	365
Ala Lys His Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly		
370	375	380
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly		
385	390	395
Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Gln Met Thr		
405	410	415
Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile		
420	425	430
Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln		
435	440	445
Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg		
450	455	460
Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
465	470	475
Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr		
485	490	495

Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 500 505 510
 Thr Lys Leu Glu Ile Thr Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 515 520 525
 Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 530 535 540

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg
 545 550 555 560
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 565 570 575
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 580 585 590
 Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 595 600 605

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 610 615 620
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 625 630 635 640
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 645 650 655
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 660 665 670

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 675 680 685
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 690 695 700
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 705 710
 <210> 17
 <211> 2130
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> Amino acid sequence of TN-OF-19

<400> 17

atggagacag acacactcct gctatggtg ctgctctct gggttccagg ttccacaggt	60
gacattgtgc tgacccaatc tccagctatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca	120
atgacttgca gggcagtc aagtgtaaat tacatggact ggtaccagaa gaagccagga	180
tcctccccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcg	240
ttcagtgcca gtgggtctgg gacctttaac tctctcacaa tcagcagagt ggaggctgaa	300
gatgctgcca ctattactg ccagcagtgg agtttaatc cacccacgtt cgagggggg	360
accaagctgg aaataaaagg cagtagtac ggtggtgct ccggggcgg ttccgttgg	420
ggcgcgcagca gcgaggtgca gtcgcagcag tctgggctg agctggtgaa gcctgggccc	480
tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattt ccagttacaa tatgcactgg	540
gttaaaggcaga cacctggaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc agggaaatgg	600
gatacttctt acaatcagaa gttcaaaaggc aaggccacat tgactgcaga caaatctcc	660
agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcgga ctattactgt	720
gcaagatcta attattacgg tagtagctac tggttttcg atgtctgggg cgccaggacc	780
acggtcaccg tctcctcagg aggtggtgaa tccgaggtga agctgcagga aagccgcct	840
ggcctggtgg ccccccagcca gaggctgagc gtgacctgca ccgtgagcgg cgtgagcctg	900
cccgactacg gcgtgagctg gatccggcag ccccccagga agggcctggaa atggctggc	960
gtgatctggg gcagcgagac cacctactac aacagccccc tgaagagccg gctgaccatc	1020
atcaaggaca acagcaagag ccaggtttc ctgaagatga acagcctgca gaccgacgac	1080
accggccatct actactgcgc caagcaactac tactacggcg gcagctacgc catggactac	1140
tggggccagg gcaccagcgt gaccgtgagc agcggcagca cctccggcag cgccaagcct	1200
ggcagcggcgc agggcagcac caagggcgcac atccagatga cccagaccac ctccagcctg	1260
agcggccagcc tggggcaccg ggtgaccatc agctgcggg ccagccagga catcagcaag	1320
tacctgaact ggtatcagca gaagccgcac ggcaccgtca agctgctgtat ctaccacacc	1380
agccggctgc acagcgccgt gcccagccgg ttttagcggca gggctccgg caccgactac	1440
agcctgacca tctccaaacctt ggaacaggaa gatatgcaca cttacttttgc ccagcaggc	1500
aacacactgc cttacacaccc tggcggcggaa acaaagctgg aaatcaccga gagcaagttac	1560
ggaccgcctt gcccccttg ccctatgttc tgggtgtgg tgggtggcgg aggctgtgt	1620
gcctgctaca gcctgcttgtt caccgtggcc ttcatcatct tttgggtgaa acggggcaga	1680

aagaaactcc tgtatatatt caaacacca tttatgagac cagtacaac tactcaagag	1740
gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgcgggtg	1800
aagttcagca gaagcgccga cgccccgtcc taccaggcagg gccagaatca gctgtacaac	1860
gagctgaacc tggcagaag ggaagagtac gacgtctgg ataagcggag aggccggac	1920
cctgagatgg gcccgaagcc tcggcggaaag aaccccccagg aaggcctgta taacgaactg	1980
cagaaagaca agatggccga ggcctacagc gagatggca tgaagggcga gcggaggcgg	2040
ggcaagggcc acgacggcct gtatcaggc ctgtccaccg ccaccaagga tacctacgac	2100
gcccgtcaca tgcaaggccct gcccccaagg	2130
<210> 18	
<211> 2136	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleic acid sequence of TN-OF-19	
<400> 18	
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccggaaattt ttttgacaca gtctccagcc accctgtctt tgtctccagg ggaaagagcc	120
accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagctact tagcctggta ccaacagaaa	180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca acagggccac tggcatccca	240
gccaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcag cagcctagag	300
cctgaagatt ttgcagttt ttaactgttag cagcgttagca actggccgat cacttcgcc	360
caagggacac gactggagat taaaggcagt actagcggtg gtggctccgg gggcggttcc	420
ggtgtggggcg gcagcagcga agtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtacagcct	480
ggcaggtccc ttagactctc ctgtcagcc tctggattica ctttaatga ttatgccatg	540
cactgggtcc ggcaagactcc agggaaaggc ctggagtggg tctcaactat tagttggaaat	600
agtggttcca taggctatgc ggactctgtg aaggccgat tcaccatctc cagagacaac	660
gccaagaagt ccctgttatct gcaaataac agtctgagag ctgaggacac ggccttgtat	720
tactgtgcaa aagatataca gtacggcaac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa	780
gggaccacgg tcaccgtctc ctcaggaggt ggtggatccg aggtgaagct gcaggaaagc	840
ggccctggcc tggggcccc cagccagago ctgagcgtga cctgcaccgt gagcggcgtg	900
agcctgccc actacggcgt gagctggatc cggcagcccc ccaggaaggg cctgaatgg	960
ctggcgtga tctggggcag cgagaccacc tactacaaca ggcctgtaa gagccggctg	1020

accatcatca aggacaacag caagagccag gtgttctga agatgaacag cctgcagacc	1080
gacgacacccg ccatctacta ctgcgccaag cactactact acggcggcag ctacgccatg	1140

gactactggg gccagggcac cagcgtgacc gtgagcagcg gcagcacctc cgccagcggc	1200
aagcctggca gccccggagg cagcaccaag ggcgacatcc agatgaccca gaccacctcc	1260
agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg accatcagct gcccggccag ccaggacatc	1320
agcaagtacc tgaactggta tcagcagaag cccgacggca ccgtcaagct gctgtatctac	1380
cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc agccggtaa gccggcagcgg ctccggcacc	1440
gactacagcc tgaccatctc caacctggaa caggaagata tcgcccaccta ctttgccag	1500
cagggcaaca cactgcccta caccttggc ggcggacaa agtggaaat caccgagac	1560

aagtacggac cccctgccc cccttgcct atgttctggg tgctgggtt ggtcgaggc	1620
gtgctggcct gctacagcct gctggtcacc gtggccttca tcattttt ggtgaaacgg	1680
ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact	1740
caagaggaag atggctgttag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg	1800
cgggtgaagt tcagcagaag cggcgtgccc cctgcctacc agcaggccca gaatcagctg	1860
tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gagtacgacg tcctggataa gcccggcacc	1920
cggaccctg agatggcgg caaggctcgg cgaaagaacc cccaggaagg cctgtataaac	1980

gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg	2040
aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggctgtt ccaccggccac caaggatacc	2100
tacgacgccc tgcacatgca gcccctgccc ccaagg	2136

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of linker between VL and VH of CD20 scfv

<400> 19

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the linker between VH and VL of CD19 scfv

<400> 20

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 21

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of the light chain of single-chain variable region (VL) derived from FMC63 antibody

<400> 21

gacatccaga	tgacacagac	tacatcctcc	ctgtctgcct	ctctgggaga	cagagtacc	60
atcagttgca	ggccaagtca	ggacattagt	aaatatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gatggaactg	ttaaactcct	gatctaccat	acatcaagat	tacactcagg	agtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tggaacagat	tattctctca	ccattagcaa	cctggagcaa	240
gaagatattg	ccacttactt	ttgccaacag	ggtaatacgc	ttccgtacac	gttggaggg	300
gggaccaagc	tggagatcac	a				321

<210> 22

<211> 360

<212> DNA

<

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of the heavy chain of single-chain variable region (VH) derived from FMC63 antibody

<400> 22

gagggtgaaac	tgcaggagtc	aggacctggc	ctggggcgc	cctcacagag	cctgtccgtc	60
acatgcactg	tctcagggt	ctcattaccc	gactatggtg	taagctggat	tcgccagecct	120
ccacgaaagg	gtctggatgt	gctgggagta	atatgggta	gtgaaaccac	atactataat	180
tcagctctca	aatccagact	gaccatcatc	aaggacaact	ccaagagcca	agttttctta	240

aaaatgaaca gtctgaaac tcatgacaca gccattact actgtccaa acattattac 300

tacggtgta gctatgctat ggactactgg ggccaaggaa cctcagtcac cgttcctca 360
<210> 23
<211> 472
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chimeric antigen receptor
<400> 23
Met Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe
20 25 30
Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile

35 40 45
Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Val Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ser Ser Gly Gly Gly

100 105 110
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Asp Val Met Gly Val Asp Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Pro
130 135 140
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160
Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Pro Ser Ser Thr

165 170 175
Leu His Tyr Ala Asp Arg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

180	185	190
Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Lys Leu Pro Ser Leu Cys		
195	200	205
Tyr Gly Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Val His Arg Leu Leu Lys Thr		
210	215	220
Arg Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe		
225	230	235
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro		
245	250	255
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys		
260	265	270
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala		
275	280	285
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu		
290	295	300
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Gly Arg		
305	310	315
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln		
325	330	335
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu		
340	345	350
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Glu Phe Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala		
355	360	365
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu		
370	375	380
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly		
385	390	395
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu		
405	410	415
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser		
420	425	430

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 435 440 445

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 450 455 460

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

465 470

<210> 24

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400

> 24

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu
 20 25 30

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
 35 40 45

Ser Leu Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro
 50 55 60

Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Thr Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser
 100 105 110

Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Met
 130 135 140

Gly Val Asp Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys
 145 150 155 160

Leu Ser Cys Ala Ala Pro Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile

180 185 190

Ser Ser Pro Ser Ser Thr Leu His Tyr Ala Asp Arg Val Lys Gly Arg

195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met

210 215 220

Lys Leu Pro Ser Leu Cys Tyr Gly Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Val

225 230 235 240

His Arg Leu Leu Thr Arg Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

245 250 255

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala

260 265 270

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe

275 280 285

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val

290 295 300

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Gly

305 310 315 320

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val

325 330 335

Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu

340 345 350

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Glu Phe Glu Leu Gly Thr Phe Lys Thr

355 360 365

Asn Asp Leu Gln Gly Ser Cys Arg Ser

370 375

<210> 25

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 25

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Met Gly Val Asp Ser Gly Gly Leu

20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Pro Gly Phe

35 40 45

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Pro Ser Ser Thr Leu His

65 70 75 80

Tyr Ala Asp Arg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro

85 90 95

Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Lys Leu Pro Ser Leu Cys Tyr Gly

100 105 110

Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Val His Arg Leu Leu Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr

130 135 140

Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met

145 150 155 160

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln

165 170 175

Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu

180 185 190

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser

195 200 205

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr

210 215 220

Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr

225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Thr Arg Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

245 250 255

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala

260 265 270

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe

275 280 285

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val

290 295 300

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Gly

305 310 315 320

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val

325 330 335

Gln Thr Thr Gln Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu

340 345 350

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Glu Phe Glu Leu Gly Thr Phe Lys Thr

355 360 365

Asn Asp Leu Gln Gly Ser Cys Arg Ser

370 375

<210> 26

<211> 396

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 26

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu

20 25 30

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro
 50 55 60
 Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr
 100 105 110

Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val
 130 135 140
 Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
 145 150 155 160
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
 165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 180 185 190
 Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
 195 200 205
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 210 215 220
 Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 225 230 235 240

Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly
 245 250 255
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Thr Arg Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 260 265 270
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

290	295	300
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
305	310	315
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser		
325	330	335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met		
340	345	350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		
355	360	365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Glu Phe Glu Leu Gly Thr		
370	375	380
Phe Lys Thr Asn Asp Leu Gln Gly Ser Cys Arg Ser		
385	390	395
<210> 27		
<211> 396		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Chimeric antigen receptor		
<400> 27		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu		
20	25	30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
35	40	45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser		
65	70	75
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser		
85	90	95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr
 115 120 125
 Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val
 145 150 155 160
 Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe
 180 185 190
 Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser
 195 200 205
 Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Arg Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 260 265 270
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 290 295 300
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 305 310 315 320
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser
 325 330 335
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

340	345	350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		
355	360	365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Glu Phe Glu Leu Gly Thr		
370	375	380
Phe Lys Thr Asn Asp Leu Gln Gly Ser Cys Arg Ser		
385	390	395
<210> 28		
<211> 715		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Chimeric antigen receptor		
<400> 28		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu		
20	25	30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
35	40	45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser		
65	70	75
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser		
85	90	95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser		
100	105	110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp		
115	120	125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly		
130	135	140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ile		

145	150	155	160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys			
165	170	175	
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp			
180	185	190	
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr			
195	200	205	
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser			
210	215	220	
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala			
225	230	235	240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly			
245	250	255	
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys			
260	265	270	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
275	280	285	
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
290	295	300	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
305	310	315	320
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
325	330	335	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
340	345	350	
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
355	360	365	
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
370	375	380	
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
385	390	395	400

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445

 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp Val
 485 490 495
 Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
 500 505 510

 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
 515 520 525
 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
 530 535 540
 Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
 545 550 555 560
 Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 565 570 575

 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 580 585 590
 Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 595 600 605
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 610 615 620
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 625 630 635 640

 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn

645	650	655
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
660	665	670
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
675	680	685
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
690	695	700

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

705	710	715
-----	-----	-----

<210> 29

<211> 715

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 29

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

20	25	30
----	----	----

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35	40	45
----	----	----

Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln

50	55	60
----	----	----

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser

85	90	95
----	----	----

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100	105	110
-----	-----	-----

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp

115	120	125
-----	-----	-----

Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130	135	140
Gly	Gly	Gly
Ser	Gly	Gly
Gly	Gly	Gly
Val	Leu	Thr
Asn	Gln	Ser
Pro	Ala	Ile
Ile	Leu	Ser
Ala	Ser	Pro
Asp	Gly	Glu
Ile	Lys	
145	150	155
Val	Leu	Thr
Gln	Ser	Pro
Ala	Ile	Ile
Ile	Leu	Ser
Ala	Ser	Pro
Gly	Glu	Lys
165	170	175
Val	Thr	Met
Thr	Cys	Arg
Ala	Ser	Ser
Ser	Ser	Val
Val	Asn	Tyr
Asp	Trp	
180	185	190
Tyr	Gln	Lys
Lys	Pro	Gly
Pro	Ser	Ser
Ser	Pro	Lys
Trp	Ile	Tyr
Ile	Tyr	Ala
Ser	Asn	Thr
Leu	Ala	Ser
Gly	Val	Pro
Pro	Ala	Arg
Phe	Ser	Gly
Gly	Ser	Ser
210	215	220
Gly	Thr	Ser
Tyr	Ser	Leu
Leu	Thr	Ile
Ile	Ser	Arg
Arg	Val	Glu
Glu	Ala	Glu
Asp	Ala	
225	230	235
Ala	Thr	Tyr
Tyr	Tyr	Cys
Gln	Gln	Trp
Trp	Ser	Phe
Ser	Asn	Pro
Pro	Pro	Thr
Thr	Phe	Gly
245	250	255
Gly	Gly	Thr
Thr	Lys	Leu
Leu	Glu	Ile
Ile	Lys	Glu
Glu	Ser	Lys
Lys	Tyr	Gly
Gly	Pro	Pro
Pro	Cys	Cys
260	265	270
Pro	Pro	Ala
Ala	Pro	Glu
Glu	Phe	Leu
Leu	Gly	Gly
Gly	Pro	Ser
Pro	Val	Phe
275	280	285
Phe	Pro	Pro
Pro	Lys	Pro
Lys	Asp	Thr
Asp	Leu	Met
Leu	Met	Ile
Ile	Ser	Arg
Arg	Thr	Pro
Pro	Glu	Glu
290	295	300
Val	Thr	Cys
Cys	Val	Val
Val	Val	Asp
Asp	Val	Ser
Ser	Gln	Glu
Gln	Glu	Asp
Asp	Pro	Glu
Glu	Val	Gln
305	310	315
Phe	Asn	Trp
Asn	Tyr	Val
Tyr	Val	Asp
Asp	Gly	Val
Gly	Val	Glu
Val	Glu	Val
Glu	His	Asn
His	Asn	Ala
Ala	Lys	Thr
Lys	Thr	Lys
Pro	Arg	Glu
Arg	Glu	Gln
Glu	Gln	Phe
Phe	Asn	Ser
Asn	Ser	Thr
Ser	Tyr	Arg
Tyr	Arg	Val
Arg	Val	Val
Val	Ser	Ser
325	330	335
Pro	Arg	Glu
Arg	Glu	Gln
Glu	Gln	Phe
Phe	Asn	Ser
Asn	Ser	Thr
Ser	Tyr	Arg
Tyr	Arg	Val
Arg	Val	Val
Val	Ser	Ser
340	345	350
Thr	Val	Leu
Val	Leu	His
His	Gln	Asp
Asp	Trp	Leu
Trp	Leu	Asn
Asn	Gly	Lys
Gly	Lys	Glu
Lys	Glu	Tyr
Glu	Tyr	Lys
Tyr	Lys	Cys
Cys	Lys	
355	360	365
Val	Ser	Asn
Asn	Lys	Gly
Gly	Leu	Pro
Leu	Pro	Ser
Pro	Ser	Ser
Ser	Ile	Glu
Ile	Glu	Lys
Glu	Thr	Ile
Thr	Ile	Ser
Ile	Ser	Lys
370	375	380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp Val
 485 490 495
 Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
 500 505 510
 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
 515 520 525
 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
 530 535 540
 Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
 545 550 555 560
 Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 565 570 575
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 580 585 590
 Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 595 600 605
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 610 615 620
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

625 630 635 640
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 645 650 655
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 660 665 670
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly

 675 680 685
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 690 695 700
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 705 710 715
 <210> 30
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chimeric antigen receptor
 <400> 30
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
 35 40 45
 Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro
 50 55 60
 Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
 65 70 75 80

 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
 100 105 110
 Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val

130 135 140

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val

145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met

165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala

180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly

195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg

225 230 235 240

Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala

245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

260 265 270

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

355 360 365

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile
 485 490 495
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 500 505 510
 Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 515 520 525

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 530 535 540
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 545 550 555 560
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln
 565 570 575
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 580 585 590

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 595 600 605
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp

610	615	620
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg		
625	630	635
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr		
645	650	655
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
660	665	670
<210> 31		
<211> 671		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Chimeric antigen receptor		
<400> 31		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu		
20	25	30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
35	40	45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser		
65	70	75
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser		
85	90	95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser		
100	105	110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp		
115	120	125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly		
130	135	140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile		

145	150	155	160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys			
165	170	175	
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp			
180	185	190	
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr			
195	200	205	
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser			
210	215	220	
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala			
225	230	235	240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly			
245	250	255	
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys			
260	265	270	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
275	280	285	
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
290	295	300	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
305	310	315	320
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
325	330	335	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
340	345	350	
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
355	360	365	
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
370	375	380	
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
385	390	395	400

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile
 485 490 495
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Ser Leu Val
 500 505 510
 Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 515 520 525
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 530 535 540
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 545 550 555 560
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln
 565 570 575
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 580 585 590
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 595 600 605
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 610 615 620
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 625 630 635 640
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr

645 650 655

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

660 665 670

<210> 32

<211> 677

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 32

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp

65 70 75 80

Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser

85 90 95

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr

145 150 155 160

Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile

165 170 175

Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr

180 185 190

Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

195 200 205

Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala

225 230 235 240

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr

245 250 255

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Glu Ser

260 265 270

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly

275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln

305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr

340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile

370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

420	425	430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
435	440	445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
450	455	460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
465	470	475
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
485	490	495
Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val		
500	505	510
Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys		
515	520	525
Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr		
530	535	540
Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu		
545	550	555
Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		
565	570	575
Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		
580	585	590
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		
595	600	605
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		
610	615	620
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		
625	630	635
Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln		
645	650	655
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		
660	665	670

Ala Leu Pro Pro Arg

675

<210> 33

<211> 672

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 33

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu

20 25 30

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe

35 40 45

Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly

65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

85 90 95

Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr

115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ile

145 150 155 160

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg

165 170 175

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp

195 200 205

Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp

225 230 235 240

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe

245 250 255

Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

260 265 270

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

275 280 285

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

290 295 300

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

305 310 315 320

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

325 330 335

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

340 345 350

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

355 360 365

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

370 375 380

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

385 390 395 400

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

405 410 415

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

420 425 430

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

435

440

445

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

450

455

460

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

465 470 475 480

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr

485

490

495

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Ser Leu

500

505

510

Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile

515

520

525

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp

530

535

540

Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu

545 550 555 560

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

565

570

575

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

580

585

590

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

595

600

605

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

610

615

620

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

625 630 635 640

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

645

650

655

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

660

665

670

<210> 34

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 34

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Asp Val Met Gly Val Asp Ser Gly Gly Gly

20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Pro Gly

35 40 45

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu

50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Pro Ser Ser Thr Leu

65 70 75 80

His Tyr Ala Asp Arg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

85 90 95

Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Lys Leu Pro Ser Leu Cys Tyr

100 105 110

Gly Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Val His Arg Leu Leu Lys Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

130 135 140

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val

145 150 155 160

Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe Met His Trp Tyr

165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser

180 185 190

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

195 200 205

Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala

210	215	220													
Ser	Tyr	Phe	Cys	His	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala
225															
Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro
245															
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
260															
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
275															
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn
290															
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
305															
310															
315															
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
325															
330															
335															
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
340															
345															
350															
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
355															
360															
365															
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu
370															
375															
380															
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
385															
390															
395															
400															
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
405															
410															
415															
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
420															
425															
430															
435															
440															
445															
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
450															
455															
460															

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala

465 470 475 480

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr

485 490 495

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

500 505 510

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser

515 520 525

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

530 535 540

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln

545 550 555 560

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

565 570 575

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

580 585 590

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met

595 600 605

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly

610 615 620

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp

625 630 635 640

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

645 650

<210> 35

<211> 670

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric antigen receptor

<400> 35

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu

1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu			
20	25	30	
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr			
35	40	45	
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg			
50	55	60	

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser			
65	70	75	80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser			
85	90	95	
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser			
100	105	110	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr			
115	120	125	

Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly			
130	135	140	
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val			
145	150	155	160
Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val			
165	170	175	
Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe			
180	185	190	

Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser			
195	200	205	
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly			
210	215	220	
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala			
225	230	235	240
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly			
245	250	255	

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 305 310 315 320

 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 385 390 395 400
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp
 485 490 495
 Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile

500 505 510

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

515 520 525

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys

530 535 540

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg Val

545 550 555 560

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn

565 570 575

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

580 585 590

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg

595 600 605

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

610 615 620

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg

625 630 635 640

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

645 650 655

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

660 665 670

<210> 36

<211> 715

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 36

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser

65 70 75 80

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser

85 90 95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100 105 110

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp

115 120 125

Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile

145 150 155 160

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys

165 170 175

Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp

180 185 190

Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr

195 200 205

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

210 215 220

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala

225 230 235 240

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly

245 250 255

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

260 265 270

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

355 360 365

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

385 390 395 400

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

450 455 460

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp Val

485 490 495

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr

500 505 510

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu

515 520 525

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg

530 535 540

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg

545 550 555 560

Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe

565 570 575

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg

580 585 590

Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser

595 600 605

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr

610 615 620

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

625 630 635 640

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn

645 650 655

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu

660 665 670

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly

675 680 685

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr

690 695 700

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

705 710 715

<210> 37

<211> 660

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 37

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu

1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu			
20	25	30	
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr			
35	40	45	
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln			
50	55	60	

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser			
65	70	75	80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser			
85	90	95	
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser			
100	105	110	
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp			
115	120	125	

Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly			
130	135	140	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile			
145	150	155	160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys			
165	170	175	
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp			
180	185	190	

Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr			
195	200	205	
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser			
210	215	220	
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala			
225	230	235	240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly			
245	250	255	

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 305 310 315 320

 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380

 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445

 Ser Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile
 485 490 495
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Ser Leu Val

500	505	510
Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe		
515	520	525
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly		
530	535	540
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg		
545	550	555
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln		
565	570	575
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp		
580	585	590
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro		
595	600	605
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp		
610	615	620
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg		
625	630	635
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr		
645	650	655
Lys Asp Thr Tyr		
660		
<210> 38		
<211> 672		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Chimeric antigen receptor		
<400> 38		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu		
20	25	30

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe

35 40 45

Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly

65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

85 90 95

Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr

115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile

145 150 155 160

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg

165 170 175

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp

195 200 205

Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp

225 230 235 240

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe

245 250 255

Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

260 265 270

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe

275	280	285
-----	-----	-----

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 290 295 300
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 305 310 315 320
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 325 330 335
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 340 345 350

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 355 360 365
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 370 375 380
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 385 390 395 400
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 405 410 415

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 420 425 430
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 435 440 445
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 450 455 460
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 465 470 475 480

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr
 485 490 495
 Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 500 505 510
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
 515 520 525

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp

530 535 540

Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

545 550 555 560

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

565 570 575

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

580 585 590

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

595 600 605

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

610 615 620

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

625 630 635 640

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

645 650 655

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

660 665 670

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 39

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> complementarity determining region

<400> 40

Asn Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 41

Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 42

Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 43

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 44

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 45

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr

1 5

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Framework region

<400> 46

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 47

Ser Tyr Asn Met His

1 5

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Framework region

<400> 48

Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 49

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Framework region

<400> 50

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 51

Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val

1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Framework region

<400> 52

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 53

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Framework region

<400> 53

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

20

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 54

Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp

1 5 10

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Framework region

<400> 55

Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 56

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Framework region

<400> 57

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 58

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr

1 5

<

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Framework region

<400> 59

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 60

Asp Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 61

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 62

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 63

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementarity determining region

<400> 64

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1

5